

MÁRCIO CHIQUITO

EMPREGO DO GEL DE ESCINA, EM APLICAÇÃO TÓPICA, NO TRATAMENTO
DE CONTUSÕES EXPERIMENTAIS DA PELE EM HAMSTERS (*Mesocricetus
auratus*)

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre, Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, Setor de
Ciências Agrárias, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Pedro Ribas
Werner

Co-Orientador: Prof Ivan Deconto

CURITIBA

2000




PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **MARCIO CHIQUITO** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“EFEITO DO GEL DE ESCINA NO TEMPO DE REPARAÇÃO DE CONTUSÕES EXPERIMENTAIS EM HAMSTERS (*Mesocriatus auratus*)”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o conceito “A” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 13 de junho de 2000.


Prof. Dr. PEDRO RIBAS-WERNER
Presidente/Orientador


Prof. Dr. METRY BACILA
Membro


Prof. Dr. CIRO ALBERTO DE OLIVIERA RIBEIRO
Membro

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer:

Ao prof. Pedro Ribas Werner, pelo seu trabalho de orientação (e incrível paciência);

Ao pessoal da BIOCOM PET SUPPLIES (Álvaro, Andrey, Marlus e Sueli), que forneceu a ração dos hamsters;

Aos Padres Jan Nowinski e Aluizio Laimann, pela ajuda na tradução de texto em polonês; neste particular, cabem também créditos a José Rodrigo Kantor e família, e à sra. Clara R. Surek;

Ao prof. Romildo Romualdo Weiss, pela ajuda na tradução de texto em alemão; cabem também créditos, neste particular, a Odair Dillman;

A todos os cidadãos brasileiros que contribuíram com os meios materiais para a execução desta dissertação;

E aos bichinhos sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

VOCATUS ATQUE NON VOCATUS DEUS ADERIT

GLORIA IN EXCELSIS DEO



SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 O CASTANHEIRO DA ÍNDIA – ASPECTOS GEOGRÁFICOS, BOTÂNICOS E HISTÓRICOS.....	2
2.2 ESTRUTURA QUÍMICA DA ESCINA.....	4
2.2.1 β -ESCINA.....	4
2.2.2 CRIPTOESCINA.....	7
2.2.3 α -ESCINA.....	7
2.2.4 HIPOESCINA.....	7
2.3 FARMACOLOGIA DA ESCINA.....	7
2.4 FARMACODINÂMICA DA ESCINA.....	11
2.5 TOXICOLOGIA.....	12
2.6 O PRODUTO.....	14
2.7 O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	17
2.8 CONTROLE DA DOR E OBSERVAÇÕES TOXICOLÓGICAS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODO	24
3.1 ANIMAIS.....	24
3.2 INDUÇÃO DAS LESÕES.....	25
3.3 AÇÃO DO GEL DE ESCINA SOBRE A PELE ÍNTEGRA.....	26

3.4	CONTROLE DA DOR E OBSERVAÇÕES TOXICOLÓGICAS.....	27
3.5	ACOMPANHAMENTO E REGISTRO DA EVOLUÇÃO DAS LESÕES.....	27
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4	RESULTADOS	29
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE TABELAS

1	Alterações nos valores médios, em mg%, de ions pela adição de água destilada e de escina no meio sobrenadante de carcinoma ascítico murino de Ehrlich em cultivo celular.....	10
2	Dose letal 50 da escina isolada, segundo a espécie animal.....	13
3	Frequência dos sinais observado em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	29
4	Resultados do teste da área sob a curva normal para a diferença entre as frequências dos fenômenos observados em em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	33
5	Tempo médio, em horas, de surgimento dos fenômenos observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental (lado controle).....	34
6	Tempo médio, em horas, de surgimento dos fenômenos observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental (lado tratado).....	34
7	Análise de variância dos tempos médios de surgimento, nos lados tratado e controle, dos sinais observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	35
8	Resultados do teste t de Student para a diferença entre os tempos médios de surgimento dos sinais observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	35

9	Tempo médio, em horas, de duração dos sinais observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental (lado controle).....	36
10	Tempo médio, em horas, de duração dos sinais observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental (lado tratado).....	37
11	Análise de variância dos tempos médios de duração, nos lados tratado e controle, dos sinais observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	38
12	Resultados do teste t de Student para a diferença entre os tempos médios de duração dos sinais observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	38
13	Área média da lesão, em milímetros quadrados, no lado controle, em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental....	40
14	Área média da lesão, em milímetros quadrados, no lado tratado, em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental....	40
15	Análise de variância, nos lados tratado e controle, da área da lesão em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental....	41
16	Resultados do teste t de Student para a diferença entre médias de área da lesão em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	41
17	Variação da espessura média da lesão, em milímetros, no lado controle, em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	43

18	Variação média da espessura da lesão, em milímetros, no lado tratado, em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental....	43
19	Análise de variância, nos lados tratado e controle, da espessura da lesão em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	44
20	Resultados do teste t de Student para a diferença entre médias de espessura da lesão em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	44
21	Tempos médios para cura da lesão, em horas, nos lados controle e tratado, em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	46
22	Análise de variância, nos lados tratado e controle, dos tempos médios de cura da lesão em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	46
23	Resultados do teste t de Student para a diferença entre os tempos médios de cura da lesão em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Castanheiro da Índia (<i>Aesculus hippocastanum</i> L.).....	3
2. Fórmula estrutural da proescigenina.....	4
3. Fórmula estrutural do barringtogenol.....	5
4. Fórmula estrutural da β -amirina, apresentando a numeração dos carbonos do triterpeno.....	5
5. Heterosídeo principal da escina – fórmula estrutura.....	16
6. Representação esquemática da estrutura de um capilar.....	17
7. Representação esquemática das forças envolvidas no fluxo fisiológico de água entre os capilares e o tecido circunvizinho.....	18
8. Frequência dos sinais observados em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	29
9. Hiperemia no sítio de contusão experimental em hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	30
10. Hemorragia subcutânea no sítio de contusão experimental em hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	31
11. Necrose cutânea em hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetido à contusão experimental.....	32
12. Descamação cutânea observada em hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetido à contusão experimental.....	33
13. Tempo médio, em horas, de surgimento dos sinais clínicos em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	36
14. Tempo médio, em horas, de duração dos sinais clínicos em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos à contusão experimental.....	39

15. Área média, em milímetros quadrados, da lesão em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos a contusão experimental.....	42
16. Variação, de acordo com o tempo decorrido, da espessura da lesão, em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos a contusão experimental.....	45
17. Tempo médio, em horas, para cura das lesões em hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) submetidos a contusão experimental.....	47

RESUMO

O propósito da presente dissertação é determinar a efetividade do gel de escina na resolução de contusões experimentais em animais. Empregaram-se 32 hamsters de ambos os sexos, mantidos em cativeiro. As contusões foram provocadas experimentalmente em 21 animais. Para tanto, prendeu-se durante 120 segundos, com uma pinça de Kocher, a pele do animal anestesiado com quetamina e xilazina. A operação foi realizada nas faces laterais de ambas as coxas do animal. Imediatamente após o surgimento dos sinais de edema, o gel de escina foi aplicado topicamente em um dos lados, escolhido por sorteio. O outro lado foi usado como controle. A espessura e dimensões de cada lesão foram medidas a cada doze horas até a cura, bem como o tempo para o surgimento e duração de cada sinal clínico. A lesão era considerada curada quando do desaparecimento do edema, hematoma e inflamação. Os resultados foram os seguintes: a espessura média da lesão no lado tratado foi menor do que no lado controle, apresentando significância estatística. O número de casos de necrose cutânea no lado tratado (14) foi maior que o número de casos no lado controle (6), apresentando significância estatística. O tempo médio de cura das lesões tratadas (152,19 horas) foi menor do que o tempo médio de cura das lesões testemunhas (170,28 horas), apresentando significância estatística. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas médias da lesão tratada e controle. Os restantes 11 animais serviram para testar a ação do gel de escins sobre a pele íntegra. Neste grupo, registrou-se apenas um caso de descamação muito discreta. Conclui-se que: a escina aplicada por via percutânea apresenta ação antiinflamatória local e é efetiva na terapia das contusões em hamsters. O

gel de escina aparenta não acelerar significativamente a velocidade de redução da área lesada após contusão experimental. O gel de escina, neste modelo experimental, parece provocar necrose superficial da pele nas lesões tratadas. O tratamento com o gel de escina acelera o processo de reparação das lesões contusas.

ABSTRACT

The purpose of this dissertation is evaluate action of an aescin-containing gel in the treatment of experimental contusions in animals. Thirty-two captive hamsters of both sexes were used. The contusions were experimentally provoked in 21 animals. The experimental animal was anaesthetized with ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. Its skin was grasped with a Kocher grasp during 120 seconds. This operation was realized in lateral faces of both legs. Immediately after the onset of oedema, the aescin-containing gel was topically applied in a side choiced at random. The other side was used as control. Thickness of lesions was measured every 12 hours until complete healing. Lesion area was measured every 24 hours. Times of clinical signs onset and duration were registered. Healing was considered complete after disappearing of oedema, inflammation and haemorrhage. Here are the results. The median thickness of treated lesion was lower than control lesion, with statistical significance. The number of necrosis cases was 14 in treated side and six in control side; this difference has statistical significance. Median time of healing was 152,19 hours for treated lesions and 170,28 hours for control lesions; this difference has statistical significance. Areas of treated and control lesions hasn't statistically significant difference. The other 11 animals were exposed to aescin-containing gel over intact skin. Only one case of discrete peeling was registered. Aescin topically applies presents antiinflammatory effect and is effective in the treatment of contusions in hamsters, reducing the healing time. The aescin-containing gel don't appears fast reduction of lesion area. In this experimental model, aescin-containing gel appears induce cutaneous necrosis.

1. INTRODUÇÃO

A escina é uma saponina contida na semente do castanheiro da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.) que apresenta ação antiinflamatória e antiedematosa, e ainda possui a reputação de ser um "protetor da rede capilar" (CEBO *et al.*, 1976; BRUNETON, 1991). A escina comercial consiste em uma mistura de vários heterosídeos e, em Medicina Humana, é usada por via parenteral em casos de edema cerebral e lesão muscular (SANTOS e CARVALHO, 1994). As preparações em gel são usadas em pessoas para prevenção e tratamento de distúrbios vasculares periféricos, edema pós-cirúrgico (ZANINI *et al.*, 1995), hematomas, tromboflebites, contusões (LANG, 1974) e na Medicina Esportiva (PABST e KLEIN, 1985).

Os veterinários que trabalham com equinos usam o gel de escina topicamente após venopunção para prevenir e reduzir o edema perivascular. Outros profissionais veterinários usam o gel de escina de maneira semelhante em cães e bovinos (DECONTO, I., Comunicação pessoal, 1998). A literatura faz poucas menções ao uso da escina em Medicina Veterinária. Este fármaco não é citado nem por BISHOP *et al.* (1993), que compilaram um moderníssimo formulário veterinário, nem pela BRITISH PHARMACOPOEA COMMISSION (1993) como tendo emprego em Medicina Veterinária. Parece, também, que a maioria dos trabalhos versa sobre o uso parenteral, e não tópico, da escina, existindo dúvidas, inclusive, quanto à efetividade do uso percutâneo (LIN & FRISCHMAN, 1996).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CASTANHEIRO DA ÍNDIA – ASPECTOS GEOGRÁFICOS, BOTÂNICOS E HISTÓRICOS

O nome “Castanheiro da Índia” não corresponde inteiramente à verdade. Esta árvore ocorre nas montanhas do norte da Grécia, Bulgária, Cáucaso, norte do Irã, e Himalaia. Acontece que, até o século XVII, os europeus ocidentais importavam as castanhas do Império Otomano, julgando que elas provinham da Índia. Na verdade, os otomanos as colhiam na Tessália e no Épiro (QUER, 1985). O castanheiro da Índia adapta-se a vários tipos de solo e clima. É muitíssimo freqüente em países europeus, especialmente na França, onde foi introduzido em 1615. Foi introduzido no Brasil no século XIX (PIO CORREA, 1984).

O castanheiro da Índia foi introduzido e cultivado na Grã-Bretanha, Dinamarca e Escandinávia, e na Rússia, na região de São Petersburgo (ex-Leningrado) e Narva (HÄNSEL *et al.*, 1992). Curiosamente, os primeiros a usar a castanha da Índia em terapêutica foram os alveitares turcos, que, há 400 anos, a recomendavam para os problemas respiratórios dos cavalos. Por isso o nome científico da árvore é *hippocastanum*: “castanha de cavalo” (QUER, 1985). Resquícios da velha prática de usar a castanha da Índia em terapêutica equina ainda podem ser detectados em expressões que designam o castanheiro da Índia em várias línguas modernas: *horse chestnut* em inglês, *chataignier de cheval* em francês, *castagna di cavalli* em italiano, e *Pferdekastanie* em alemão (HÄNSEL *et al.*, 1992).

Medicamentos caseiros à base de castanha da Índia são ainda usados no norte da Europa, principalmente na Polônia (CEBO *et al.*, 1976).

O castanheiro da Índia, representado na figura 2, é uma árvore frondosa. Alcança 25m de altura, possuindo folhas digitadas, de pecíolo longo, com cinco a sete folíolos oblongos. Suas flores brancas ou amareladas organizam-se em ráceros piramidais (PIO CORREA, 1984).



FIGURA 1. Castanheiro da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.)

As sementes do castanheiro da Índia contêm de 3,5 a 28% de escina (KARUZA-STOJAKOVIĆ, PETRIČIĆ e ŠMIT, 1991). A concentração da saponina na semente atinge o máximo por volta de agosto (no Hemisfério Norte). Logo que a semente começa a germinar, o teor de escina decai, o que leva a crer que essa saponina participa do metabolismo do embrião vegetal (KARUZA-STOJAKOVIĆ, PETRIČIĆ e ŠMIT, 1991).

2.2 ESTRUTURA QUÍMICA DA ESCINA

2.2.1. β -ESCINA

A estrutura geral dos heteroglicosídeos da β -escina compreende: um triterpeno, dois ácidos orgânicos esterificados ao mesmo, e três resíduos de açúcares (BRUNETON, 1991; HÄNSEL *et al.*, 1992). O triterpeno pode ser a proescigenina ou o barringtogenol C, que estão representados nas figuras 2 e 3.

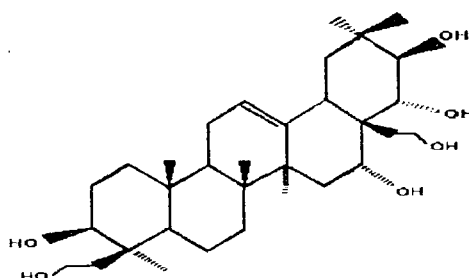


FIGURA 2. Fórmula estrutural da proescigenina. (NOVELLI, 1959; BRUNETON, 1991; HÄNSEL *et al.*, 1992)

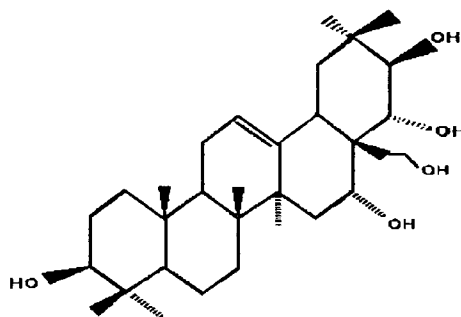


FIGURA 3. Fórmula estrutural do barringtonol (NOVELLI, 1959; BRUNETON, 1991; HÄNSEL *et al.*, 1992)

Ambos esses triterpenos têm, como precursor estrutural, a β -amirina, representada na figura 4.

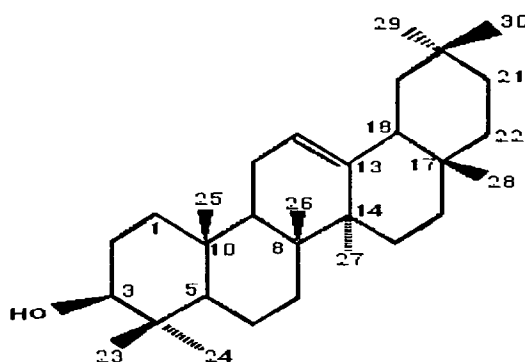


FIGURA 4. Fórmula estrutural da β -amirina, apresentando a numeração dos carbonos do triterpeno (NOVELLI, 1959; BRUNETON, 1991; HÄNSEL *et al.*, 1992)

A estrutura da β -amirina foi esclarecida pelo suíço Leopold Ruzicka (FIESER e FIESER, 1963). O seu trabalho nesse campo, aliás, lhe valeu o Prêmio Nobel de Química em 1939 (MARGENAU *et al.*, 1970).

Na β -escina [escigenina – (2-metil-3-acetoxibutirato) – (2-xilósido-4-glicosidoglicuronósido)], o triterpeno está esterificado ao ácido acético (na posição C-22) e a um outro ácido que pode ser o tíglico ou o angélico (BRUNETON, 1991; HÄNSEL *et al.*, 1992). Eventualmente os ácidos metil- α -butírico ou isobutírico podem compor esse arranjo, na posição C-21 (HÄNSEL *et al.*, 1992).

Quanto aos três resíduos de açúcares, um deles é o glicuronato. O segundo via de regra é a glicose, mas pode também ser um glicuronato. O terceiro é variável, podendo ser a glicose, a galactose ou a xilose (BRUNETON, 1991; HÄNSEL *et al.*, 1992).

Assim, o heterosídeo principal da escina, representado na figura 5, compõe-se de proescigenina esterificada ao ácido angélico (na posição C-21) e ao ácido acético (na posição C-22), e ligada a um glicuronato e duas glicoses (LEHTOLA e HUHTIKANGAS, 1990).

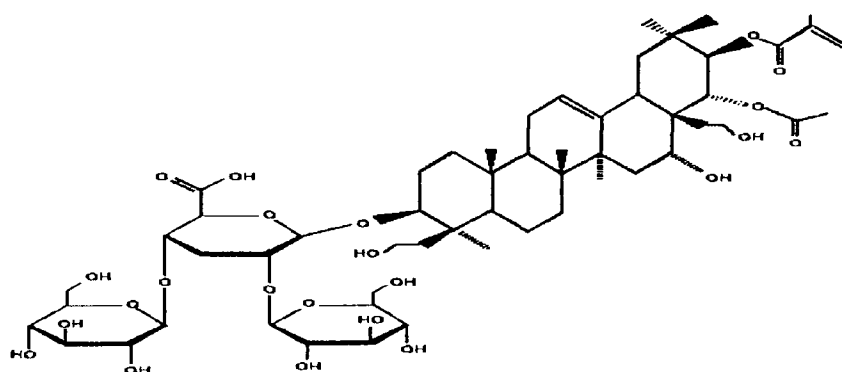


FIGURA 5. Heterosídeo principal da escina – fórmula estrutural. (BRUNETON, 1991)

2.2.2. CRIPTOESCINA

A criptoescina é isômera da β -escina, possuindo o grupo acetil na posição C-28. Além disso a criptoescina não possui a mesma atividade hemolítica da β -escina (HÄNSEL *et al.*, 1992).

2.2.3. α -ESCINA

A α -escina é uma mistura das duas formas isômeras da escina (β -escina e criptoescina). É muito estável em solução aquosa (HÄNSEL *et al.*, 1992).

2.2.4. HIPOESCINA

Trata-se da saponina contida na casca do fruto. Consiste de dois heterosídeos, cujo triterpeno é o R-1-barringtogenol. Esterificados a esse triterpeno encontram-se o ácido angélico (na posição C-21) e o ácido tiglico (na posição C-22). Os dois ácidos podem trocar de posição entre si (HÄNSEL *et al.*, 1992).

2.2. FARMACOLOGIA DA ESCINA

Para que ocorra a ação antiinflamatória e antiedematosa sistêmica da escina é imprescindível a existência de córtex adrenal íntegro (BERTI, OMINI e LONGIAVE, 1977; PANIGATI, 1992a). A escina parece estimular o córtex adrenal, aumentando a produção de glicocorticóides (SANTOS e CARVALHO, 1994). Crê-se mesmo que o córtex adrenal pode transformar a escina em compostos com ação glicocorticóide (PANIGATI, 1992a).

A remoção da hipófise dos ratos resulta em redução da ação antiedematosa da escina, e cessação da estimulação do córtex adrenal pela mesma (PANIGATI, 1992a).

A escina diminui a filtração transcápilar por redução no número e diâmetro dos poros dos capilares (SANTOS e CARVALHO, 1994), inibindo a formação local de

exsudato (PANIGATI, 1992a). Assim, o tratamento com escina potencialmente restabelecerá o equilíbrio fisiológico do fluxo de água entre os capilares e o tecido circundante (PANIGATI, 1992a). Curiosamente, a escina parece ter uma ação muito mais pronunciada sobre as vênulas do que sobre as arteríolas (LIN e FRISHMAN, 1996). A escina reduz a quantidade de exsudato na peritonite experimental. Curiosamente, neste modelo, a escina bloqueia a passagem de moléculas leves com muito mais eficiência do que a passagem de moléculas pesadas (ROTHKOPF e VOGEL, 1976). A escina também previne o edema pulmonar experimental pelo aerossol de histamina, bem como edema cerebral experimental causado por ligadura de carótida, raios X e trietilsulfato estanhoso (DE PASCALE *et al.*, 1974; PANIGATI, 1992a).

A escina polissulfonada parece ter as mesmas propriedades fibrinolíticas e antiinflamatórias da heparina. Mas, como a massa molecular da escina é 10 vezes menor que da heparina, sua difusão transcutânea é muito maior (JORNAL BRASILEIRO DE MEDICINA, 1995).

A afirmação de ser a escina um protetor da rede capilar tem fundamento. LORENZ e MAREK *apud* PANIGATI (1992 a), por meio de ventosa, provocaram petéquias em ratos alimentados com uma dieta deficiente em vitaminas C e P. O pré-tratamento dos animais com escina reduziu a formação de petéquias. Aliás, a escina é considerada uma vitamina P (MARTÍN, ALARCÓN e MOTILVA, 1990). MARTIN *apud* BONACINA e PACCHIANO (1974) estabeleceu em 1955 as cinco vias de ação para as substâncias com ação vitamínica P: a) potencialização da ação da adrenalina; b) efeito direto sobre os capilares; c) interferência com a ação da histamina; d) inibição da hialuronidase; e) potencialização da vitamina C. A escina tem conhecida ação sobre os

capilares mas é digno de nota que ela é pouco efetiva frente ao edema localizado causado pela hialuronidase (BONACINA e PACCHIANO, 1974). CEBO *et al.* (1976) crêem que a atividade de vitamina P da escina se deve à sua afinidade estrutural com o colesterol. Em situações de doença vascular, a escina reduz a liberação e a atividade de enzimas lisossomais degradadoras de glicosaminoglicanas (mucopolissacarídeos), como arilsulfatase, β -glicuronidase e β -N-acetilglicosaminidase (HÄNSEL *et al.*, 1992; LIN e FRISHMAN, 1996). Com a redução dessas enzimas, a permeabilidade dos vasos sanguíneos não aumenta (BONACINA e PACCHIANO, 1974; LIN e FRISHMAN, 1996).

A escina parece estimular, na parede dos vasos, a síntese e liberação de prostaglandinas, principalmente $\text{PGF}_{2\alpha}$, que é vasoconstritora (BERTI, OMINI e LONGIAVE, 1977), elevando o tônus e o fluxo venosos (PANIGATI, 1992b; LIN e FRISHMAN, 1996). Aplicada sobre aorta isolada, a escina determina um discreto relaxamento inicial do vaso, seguido por forte contração (CEBO *et al.*, 1976). Administrada oralmente, a escina é tão efetiva quanto as faixas de compressão para reduzir o edema de membros inferiores em pessoas com insuficiência venosa crônica (DIEHM *et al.*, 1996). A escina também melhora o fluxo linfático, sendo, também, efetiva na redução do edema de origem linfática (LIN e FRISHMAN, 1996). A escina causa também contração de músculo liso (CEBO *et al.*, 1976).

Experimentos em pessoas com a técnica de “janela cutânea” de Rebuck e Crowley comprovaram que a escina reduz a migração de células inflamatórias, particularmente os macrófagos, para o sítio lesado. Todavia, a escina não reduz nem a velocidade de translação nem a capacidade fagocítica dessas células (PANIGATI, 1992b). Aplicada por via endovenosa em cães, a escina provoca aumento do

hematócrito, desvio para a esquerda regenerativo, monocitose, linfocitose e eosinopenia (SANTOS e CARVALHO, 1994).

A escina altera os fenômenos ativos e passivos que regem a permeabilidade da membrana celular (DE PASCALE *et al.*, 1974; PANIGATI, 1992b). A Tabela 1 apresenta a sua ação na citólise *in vitro* do carcinoma murino ascítico de Ehrlich em cultivo celular, determinando uma queda moderada no valor de sódio e uma grande elevação no teor de potássio do sobrenadante.

Tabela 1. Alterações nos valores médios, em mg%, de íons após adição de água destilada e de escina no meio sobrenadante de carcinoma ascítico murino de Ehrlich em cultivo celular (PANIGATI, 1992b).

Adição	Na ⁺	K ⁺
Não	336	24,3
Água destilada	160	45
Escina	280	95

A 20°C, a escina dobra a relação Na⁺/Ca⁺² no sobrenadante do carcinoma ascítico, e aumenta a relação K⁺/Ca⁺² em 3,5 vezes. O cálcio, aliás, passa todo para o interior da célula em dois minutos. Curioso é que a 4°C não ocorrem essas mudanças na relação entre os íons do sobrenadante (PANIGATI, 1992b).

A escina, administrada a ratos na dose de 50 mg/kg, por via oral, aumenta moderadamente o volume urinário e a excreção de sódio, ao passo que eleva drasticamente a excreção de potássio e cloreto. Na dose de 25 mg/kg, porém, esses efeitos não se evidenciam (MARTÍN, ALARCÓN e MOTILVA, 1990). Parece que a escina aumenta a síntese de prostaglandinas nos vasos renais, o que causa, nesse órgão, vasodilatação, aumento da irrigação arterial e da pressão dos *vasa recta*, donde

elevação da diurese. Adicionalmente as prostaglandinas poderiam estimular a filtração glomerular (MARTÍN, ALARCÓN e MOTILVA, 1990). As alterações na excreção iônica poderiam resultar da inibição da reabsorção de sódio no ~~túbulo~~ contorcido proximal (MARTÍN, ALARCÓN e MOTILVA, 1990).

A escina pode reforçar a ação de anticoagulantes. *In vitro* a escina aumenta o tempo de trombina de 18,8 para 24,1 segundos, e pode reduzir em 3 a 7% a ação do fator V, fator VII e protrombina (HÄNSEL *et al.*, 1992).

O tratamento com escina parece aumentar a atividade da *Nitroblue Tetrazolium* redutase na parede dos vasos sangüíneos próximos a focos de angiodermite distrófica flebopática (PANIGATI, 1992b).

A escina também impede a peroxidação de lipídios por radicais livres *in vitro* (GUILLAUME e PADIOLEAU *apud* LIN e FRISHMAN, 1996).

Estudos empregando enxofre radioativo mostraram que a escina parece inibir a fixação do S^{35} nas glicosaminoglicanas sulfatadas da cartilagem xifóide de camundongos. Isto sugere que a escina reduz a velocidade de renovação (*turnover*) dessas glicosaminoglicanas (PANIGATI, 1992a).

2.3. FARMACODINÂMICA DA ESCINA

Administrada por via endovenosa no rato, a ação máxima da escina ocorre 16 horas após a injeção. Em contrapartida, essa ação máxima ocorre apenas uma hora após a administração oral (TARAYRE e LAURESSERGUES, 1975).

A meia-vida da escina na corrente sangüínea é de 10 a 19 horas (KUNZ *et al.*, 1991; HÄNSEL *et al.*, 1992). A escina tem grande afinidade pela albumina, e sua ligação à proteína plasmática humana chega a 84% (HÄNSEL *et al.*, 1992).

A escina é instável em meio ácido. Por isso, quando administrada por via oral, as formas farmacêuticas de liberação lenta proporcionam maior biodisponibilidade média (KUNZ *et al.*, 1991).

A administração de escina por via oral origina dois picos de concentração plasmática. Pensa-se que isto é devido à recirculação êntero-hepática do fármaco (KUNZ *et al.*, 1991).

Aplicada por via cutânea, a escina tende a se restringir ao sítio de aplicação e adjacências. Apenas uma fração mínima chega aos órgãos internos (LANG, 1974).

Independente da via de administração, a escina pode ser eliminada pela bile e pela urina, se bem que a filtração renal da escina é pequena (HÄNSEL *et al.*, 1992). Podem-se encontrar nesses fluidos escina intacta e seus metabolitos (HÄNSEL *et al.*, 1992).

O principal metabolito da escina no sangue e urina humanos é o escinol (LEHTOLA e HUHTIKANGAS, 1990). No escinol, os ácidos angélico e acético nas posições C-21 e C-22 são substituídos por hidroxilas (LEHTOLA e HUHTIKANGAS, 1990).

2.4. TOXICOLOGIA

Quando usada por via parenteral, a escina deve obrigatoriamente ser administrada por via intravenosa lenta. Extravasamento da escina provoca violenta necrose de coagulação no tecido subcutâneo (JORNAL BRASILEIRO DE MEDICINA, 1995). A injeção intraarterial provoca severa reação de vasoconstrição (JORNAL BRASILEIRO DE MEDICINA, 1995).

Utilizada em altas doses, a escina pode causar hemólise (SANTOS e CARVALHO, 1994), mas certamente isto é mais provável de acontecer com administração parenteral. Como saponina que é, a escina tem atividade hemolítica que no entanto é muito mais acentuada *in vitro* do que *in vivo*. Isto por que a albumina sérica desempenha um papel protetor (BAMONTE *et al.*, 1976), graças à sua afinidade pela escina (HÄNSEL *et al.*, 1992).

A tabela 2 apresenta a dose letal 50 da escina para várias espécies animais.

Tabela 2. Dose letal 50 da escina isolada, segundo a espécie animal (HÄNSEL *et al.*, 1992.)

Animal	Dose (mg/kg)	Via
Camundongo	9,3	Intravenosa
Coelho	5	Intravenosa
Rato	16,8	Intravenosa
Porco da Índia	9,1	Intravenosa
Porco	4	Intravenosa
Cão	3	Intravenosa

Deve-se notar que a DL_{50} para hamsters não foi ainda determinada.

Já houve casos de reação anafilática em pessoas após injeção intravenosa da escina (HÄNSEL *et al.*, 1992; JORNAL BRASILEIRO DE MEDICINA, 1995). É notável que a escina entrava na composição do *venocuran*, glicosídeo empregado antigamente em Cardiologia e apontado como responsável por casos de pseudolúpus idiopático em seres humanos (LIN e FRISHMAN, 1996).

A escina, usada por via parenteral, pode ser nefrotóxica (BRUNETON, 1991; HÄNSEL *et al.*, 1992; LIN e FRISHMAN, 1996). Ratos receberam escina endovenosa por oito semanas, nas doses de 9, 30 e 90 mg/kg. Houve mortes no grupo que recebia 90 mg/kg. Aumentou o consumo de água do grupo que recebia 30 mg/kg, presumivelmente devido a alteração da função renal. A dose de 9 mg/kg não provocou alterações

patológicas (HÄNSEL *et al.*, 1992). Por sinal, a escina é contraindicada em casos de comprometimento renal (JORNAL BRASILEIRO DE MEDICINA, 1995).

TAKEGOSHI *et al.* *apud* LIN e FRISHMAN (1996) relataram a ocorrência de lesão hepática causada por escina aplicada por via parenteral em seres humanos.

Administrada por via oral, a escina pode causar irritação gastrointestinal (HÄNSEL *et al.*, 1992; LIN e FRISHMAN, 1996).

Parece que repetidas aplicações de escina podem causar destruição do timo (PANIGATI, 1992a).

A escina, injetada por via intraperitoneal em ratos jovens nas doses de 9 e 30 mg/kg, não provocou alterações da fertilidade (HÄNSEL *et al.*, 1992).

Coelhas receberam escina por via oral durante seis dias após o acasalamento. A dose de 100 mg/kg nada provocou, mas a dose de 300 mg/kg causou redução do peso dos fetos (HÄNSEL *et al.*, 1992).

Não foram executados com a escina experimentos sobre carcinogenicidade e mutagenicidade (HÄNSEL *et al.*, 1992).

2.5. O PRODUTO

A apresentação comercial mais comum da escina em gel¹ contém, por grama, 10 mg de escina sódica, 10 mg de escina polissulfonada amorfa e 5 mg de salicilato de dietilamina (KOROLKOVAS, 1995). Segundo informações do fabricante, o excipiente é composto de etanol, polímero de carboxivinila, trietanolamina, óleo de lavanda e de flor de laranja amarga, e água desmineralizada.

¹ Reparil Gel, BYK Química e Farmacêutica, S. Paulo, Brasil.

O óleo da flor de laranja amarga (*Citrus aurantium* L. = *Citrus vulgaris* Risso) contém (+)-linalol livre e esterificado, (+)-limoneno, nerolidol, antranilato de metila e aldeídos alifáticos (BRUNETON, 1991); SANTOS, TORRES e LEONART (1988) citam a existência de citral, derivados do caroteno e heterosídeos flavônicos (como o hesperidosídeo) nos óleos da laranja amarga. O óleo de lavanda (*Lavandula angustifolia* P. Miller = *Lavandula vera* DC) contém linalol, geraniol e borneol livres e esterificados (SANTOS, TORRES e LEONART, 1988; BRUNETON, 1991).

O salicilato de dietilamina é um composto iônico, resultante da reação entre o ácido salicílico e a dietilamina, que é uma amina alifática básica (MORRISON e BOYD, 1996). São conhecidíssimas as propriedades antiinflamatórias do salicilato, inibidor da síntese de prostaglandinas. No entanto, não se encontrou nenhum dado sobre qualquer ação terapêutica da dietilamina. Esta, na concentração de 78-184 ppm no ar, pode causar irritação do trato respiratório de camundongos. Sua concentração letal 50 no ar é de 4.000 ppm por quatro horas para o rato (RICHARDSON e GANGOLLI, 1993). Ensaio de genotoxicidade com *Salmonella typhimurium* resultaram negativos (RICHARDSON e GANGOLLI, 1993). A dietilamina foi implicada na formação de compostos N-nitroso a partir de alimentos *in vivo* e *in vitro* (RICHARDSON e GANGOLLI, 1993). Isto poderá constituir um futuro empecilho na utilização deste gel de escina em animais produtores de carne e leite, pois existe a probabilidade de a dietilamina deixar resíduos nesses produtos.

O etanol é um conhecido solvente para várias formas farmacêuticas (LEWIS, 1994). Em preparações tópicas, ele pode aumentar a penetração de outras substâncias (LEWIS, 1994).

O polímero carboxivinílico (*Carbopol*) é um polímero do ácido acrílico, combinado à alil-sacarose ou alil-éteres do pentaeritritol. Forma na água soluções coloidais ácidas que, quando neutralizadas, formam gel altamente viscoso. Essa viscosidade perde-se rapidamente sob ação da luz (HAASE e McGINITY, 1994). O *Carbopol* é tido como inativo, pouco tóxico e não irritante, não havendo evidência de reação alérgica ao produto aplicado topicamente em pessoas (HAASE e McGINITY, 1994). É indicado pelo *FDA Inactive Ingredients Guide* para preparações oftálmicas, retais e tópicas, além de tabletes e suspensões orais (HAASE e McGINITY, 1994). Todavia, só é aprovado para uso enteral o *Carbopol* designado pela letra P (Carbomer 934P, por exemplo), que tem baixa toxicidade gastrointestinal e baixo teor de benzeno (HAASE e McGINITY, 1994). O *Carbopol* mais antigo apresentava resíduos de benzeno remanescente do processo de polimerização. Atualmente, este malfadado solvente vem sendo substituído pelo acetato de etila (HAASE e McGINITY, 1994).

A trietanolamina é outra amina orgânica polar. Serve para neutralizar o *Carbopol* e aumentar sua resistência à luz ultravioleta (HAASE e McGINITY, 1994). Forma sabões com ácidos graxos em proporção equimolecular. Além disso, age como tampão, solvente e umectante (FLEITMAN, FUJIKI e LEE, 1994; RICHARDSON e GANGOLLI, 1993). A trietanolamina é considerada pouco tóxica, sendo indicada pelo *FDA Inactive Ingredients Guide* para preparações tópicas, vaginais e retais (FLEITMAN, FUJIKI e LEE, 1994). Todavia, aplicada por via cutânea a porcos da Índia, na dose de 8 g/kg/dia, por 5 dias/semana, causou mortes. À necropsia, encontraram-se congestão pulmonar, adrenal e hepática, e necrose epitelial (RICHARDSON e GANGOLLI, 1993). A trietanolamina pode, na dose de 560 mg, aplicada por via cutânea, causar leve irritação em coelhos. Pessoas com exposição

ocupacional à trietanolamina podem apresentar dermatite alérgica de contato, lesões vesiculares eritematosas, eczema e irritação cutânea (RICHARDSON e GANGOLLI, 1993). A trietanolamina pode ser irritante para a pele humana mesmo em produtos formulados (FLEITMAN, FUJIKI e LEE, 1994). Ensaio de genotoxicidade com *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, hepatócitos de rato (*in vitro*) e drosófilas resultaram negativos (RICHARDSON e GANGOLLI, 1993). Administração de 0,3% de trietanolamina na dieta, por toda a vida de camundongos, parece estar associada ao aumento significativo da incidência de tumores malignos (RICHARDSON e GANGOLLI, 1993). Todavia, o estudo de MAEKAWA *et al. apud* RICHARDSON e GANGOLLI (1993) indica que a trietanolamina não é carcinogênica.

2.6. O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A figura 6 representa a estrutura dos capilares. Pode-se ver que as células endoteliais ligam-se umas às outras pelo cimento intercelular. As vesículas de pinocitose carregam macromoléculas de um a outro lado do endotélio (BANKS, 1992)

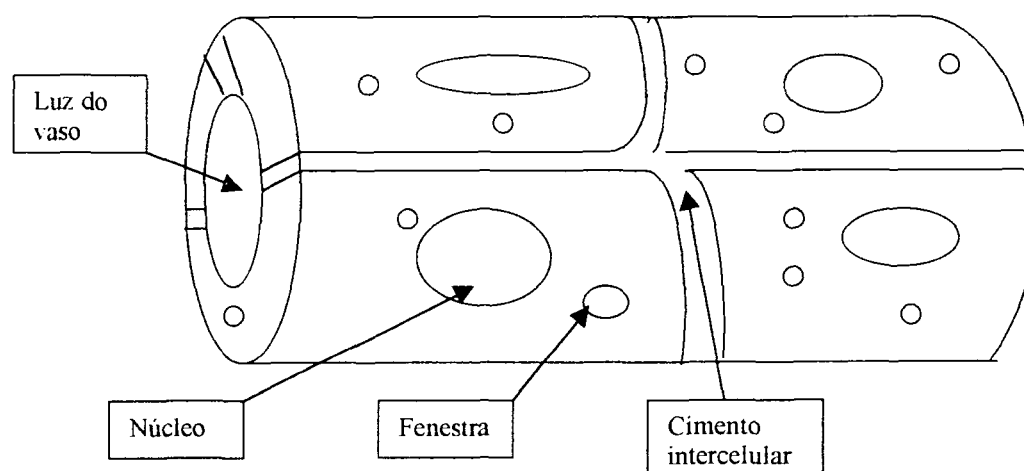


FIGURA 6. Representação esquemática da estrutura de um capilar.

Dependendo da localização de um capilar, as fenestras aparecem em números maiores ou menores (BANKS, 1992). Associadas ao endotélio, há fibras musculares lisas, que são as células de Rouget. Há ainda uma população de células pericapilares, compreendendo histiócitos, fibroblastos e mastócitos (BANKS, 1992).

O equilíbrio fisiológico do fluxo de água entre o tecido conjuntivo e os pequenos vasos depende das forças abaixo esquematizadas.

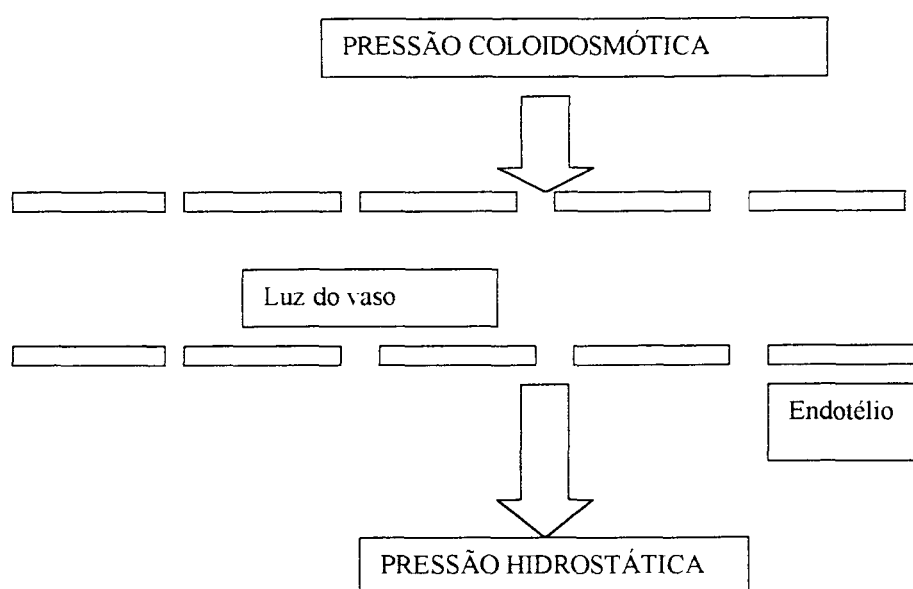


FIGURA 7. Representação esquemática das forças envolvidas no fluxo fisiológico de água entre os capilares e o tecido circunvizinho (BANKS, 1992; CHEVILLE, 1994).

No setor arteriolar, a pressão hidrostática sanguínea (PHS) é determinada pelo coração, e corresponde a 25 mmHg. A pressão hidrostática intersticial (PHI) corresponde a -6,3 mmHg (BANKS, 1992). Assim, a pressão hidrostática efetiva (PHE) corresponde a:

$$PHE = PHS - PHI = 25 - (-6,3) = 25 + 6,3 = 31,3 \text{ mmHg.}$$

A pressão coloidosmótica sangüínea (PCOS) equivale a 28 mmHg. A pressão coloidosmótica intersticial (PCOI) é de 5 mmHg (BANKS, 1992). Portanto, a pressão coloidosmótica efetiva (PCOE) equivale a:

$$PCOE = PCOS - PCOI = 28 - 5 = 23 \text{ mmHg.}$$

A diferença entre PHE e PCOE é a *força de drenagem líquida* ou *pressão de filtração* (PF):

$$PF = PHE - PCOE = 31,3 - 23 = 8,3 \text{ mmHg.}$$

No setor venular, a pressão hidrostática sangüínea é de 10 mmHg, e a pressão hidrostática intersticial é de - 6,3 mmHg. Assim a pressão hidrostática capilar equivale a:

$$PHE = PHS - PHI = 10 - (- 6,3) = 10 + 6,3 = 16,3 \text{ mmHg.}$$

A pressão coloidosmótica sangüínea desse setor é de 28 mmHg, e a pressão coloidosmótica intersticial é de 5 mmHg (BANKS, 1992). A pressão coloidosmótica efetiva equivale a:

$$PCOE = PCOS - PCOI = 28 - 5 = 23 \text{ mmHg.}$$

A diferença entre a pressão hidrostática efetiva e a coloidosmótica efetiva é a *pressão de reabsorção* (PR):

$$PR = PHE - PCOE = 16,3 - 23 = - 6,7 \text{ mmHg.}$$

A pressão de filtração move o líquido na direção do tecido intersticial, enquanto que a pressão de reabsorção move o líquido na direção do vaso capilar (BANKS, 1992). Como a primeira equivale a 8,3 mmHg, e a segunda é de - 6,7 mmHg, algum líquido permanecerá no espaço intersticial. É claro que este líquido será logo drenado pelos vasos linfáticos (BANKS, 1992). O edema só começa a se manifestar depois que a pressão de filtração aumenta em mais de 70% (BANKS, 1992).

Os sinais cardeais da inflamação — tumor, rubor, calor e dor — foram mencionados pela primeira vez por Celsus (30 a. C. – 38 d. C.), médico romano contemporâneo de Jesus Cristo, discípulo de Asclepiades da Bitúnia e compilador do conhecimento médico do seu tempo (SINGER, 1947; JONES e HUNT, 1983). Segundo uma versão, o quinto sinal cardinal — a perda de função — foi acrescentado pelo médico grego Galeno (130 – 200); segundo outra versão, esse sinal foi adicionado pelo cientista alemão Rudolf Virchow, fundador da moderna Patologia (JONES e HUNT, 1983; CHEVILLE, 1994).

Julius Conheim, patologista alemão, determinou os eventos circulatórios da inflamação em 1867. Em 1875, Julius Arnold, usando carvão injetado intravenosamente, estudou as lesões vasculares do processo inflamatório. A técnica de Arnold é usada até hoje, mas o carvão é substituído pelo azul de tripan. A interpretação dos sinais inflamatórios coube a Lewis em 1927 (CHEVILLE, 1994).

Na situação de inflamação cutânea por contusão, o primeiro evento a ocorrer é uma vasoconstrição momentânea (PABST e KLEIN, 1986; TIZARD, 1998). A seguir ocorre vasodilatação e rubor. Este é inicialmente causado por mediadores vasoativos como histamina e leucotrienos (CHEVILLE, 1994). Os queratinócitos lesados liberam interleucina 1, para ativar os queratinócitos vizinhos (HARGIS e LIGGITT, 1993). Por estímulo nervoso, as arteríolas próximas à área lesada abrem-se, originando um halo róseo em torno da lesão, nem sempre perceptível (CHEVILLE, 1994). Lewis comprovou que o secionamento prévio do nervo cutâneo regional impede o aparecimento do halo (CHEVILLE, 1994).

Como resultado, o fluxo sanguíneo se torna mais lento, e se sucedem a estagnação, hipoxia e hipoglicemia locais (CHEVILLE, 1994). Os mastócitos liberam

heparina, serotonina e leucotrienos, e sobretudo histamina, que aumenta a permeabilidade vascular (CHEVILLE, 1994). Deve-se lembrar que a escina tem ação anti-histamínica. Devido à hipoxia, o endotélio sofre edema celular agudo. As fosfolipases do endotélio liberam ácido araquidônico da bicamada lipídica e inicia-se a cascata das prostaglandinas e leucotrienos (TIZARD, 1998). Entre estes personagens contam-se o leucotrieno B₄, quimiotático para neutrófilos e eosinófilos; leucotrienos C₄ e D₄, que aumentam a permeabilidade vascular e causam forte contração da musculatura lisa; e prostaglandina F_{2α} e tromboxano A₂, vasoconstritores (TIZARD, 1998).

O endotélio se torna adesivo para os leucócitos, facilitando a saída deles para o espaço extravascular (CHEVILLE, 1994). O processo de adesão é bastante curioso. No sítio lesado, o fator de necrose tumoral alfa, que é produzido pelos queratinócitos, leva as células endoteliais a expressar a molécula de adesão intercelular 1 (MAIC-1) (HARGIS e LIGGITT, 1993). A histamina, interleucina 1 e trombina fazem as células endoteliais expressarem em sua superfície a selectina P. Esta glicoproteína se liga transitoriamente à selectina L da superfície neutrofílica, que está ligada ao carboidrato X de Lewis. Assim, os neutrófilos perdem velocidade e passam a rolar sobre o endotélio. O fator de ativação plaquetário faz os neutrófilos expressarem a integrina GD11a/GD18, que se liga firmemente à molécula de adesão intercelular 1, o que causa a parada total do neutrófilo (TIZARD, 1998). Ai então o neutrófilo insere seus pseudópodos entre as células endoteliais e faz a diapedese (TIZARD, 1998). Posteriormente as células endoteliais expressam a selectina E, que aumenta a adesividade. Os neutrófilos e basófilos são as primeiras células a chegar ao espaço extravascular. Os macrófagos chegam mais tarde, passando por um processo de parada similar ao dos neutrófilos (TIZARD, 1998).

No exterior dos vasos, os neutrófilos entrarão no processo de explosão respiratória e liberarão H_2O_2 , proteases, lisozima e bradicinina. Esta última é responsável por aumento da permeabilidade vascular e pela dor (CHEVILLE, 1994; TIZARD, 1998). Evidentemente, este processo deve ser controlado, sob pena de haver severos danos teciduais. Assim, a ameaça dos peróxidos é neutralizada pela catalase e peroxidases. O superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é neutralizado pela superóxido dismutase, ceruloplasmina e íons cobre (TIZARD, 1998). Mas ainda há um outro fator de complicação. Os neutrófilos são células de vida curta, que sofrem apoptose. Neste processo, porém, ocorrem alterações dos lipídios dos neutrófilos. Os macrófagos reconhecem essas alterações e fagocitam os neutrófilos, impedindo a fuga de enzimas lisossomais e radicais livres do interior dos neutrófilos. Os macrófagos também liberam a α_1 antitripsina e α_2 macroglobulina, que reduzem a atividade das proteases lisossomais (TIZARD, 1998).

Com a polimerização do fibrinogênio forma-se a rede de fibrina, que, por um lado, causa trombos e bloqueio dos vasos linfáticos, e por outro, restringe o processo inflamatório e serve de base para o processo de reparação (CHEVILLE, 1994).

No parênquima, além da síntese de pirogênios, ocorre aumento do teor de ácido hialurônico, que fluidifica a substância fundamental amorfa (CHEVILLE, 1994). Os macrófagos ainda liberam collagenases e elastases (TIZARD, 1998).

No processo de reparação, o teor de ácido hialurônico decai. Os fibrócitos, e talvez mesmo os pericitos e células endoteliais, tornam-se fibroblastos, que passam a produzir colágeno (CHEVILLE, 1994). A interleucina 1 liberada pelos macrófagos (TIZARD, 1998) e o *Transforming Growth Factor* (TGF) β liberado pelos queratinócitos (HARGIS e LIGGITT, 1993) ativam os fibroblastos. Formam-se então,

sob a influência da hipoxia e da baixa pressão sanguínea, brotos vasculares sinciciais (CHEVILLE, 1994). O TGF α , liberado pelos queratinócitos, também estimula a angiogênese (HARGIS e LIGGITT, 1993). Inicia-se a fibroplasia. A escara, rica em colágeno, forma-se na superfície da lesão, e o epitélio progride por sob ela (CHEVILLE, 1994). Assim que o nível de oxigênio estiver normalizado, a formação de vasos sanguíneos termina (TIZARD, 1998).

2.7. CONTROLE DA DOR E OBSERVAÇÕES TOXICOLÓGICAS

A dor causada pelas contusões experimentais classifica-se como somática superficial (CRANE, 1987), mediada por fibras de pequeno diâmetro (KITCHELL, 1987). O controle dessa dor pode ser feito logo após a indução das lesões experimentais, por infiltração com bupivacaína², que é um anestésico local de longa ação, e que certamente não interfere com o processo inflamatório (CRANE, 1987; ALLEN *et al.*, 1993).

² Neocaina 0,25% sem Vasoconstritor. Cristália, S. Paulo, Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Empregaram-se 32 hamsters (*Mesocricetus auratus*), de ambos os sexos, adultos, de 80 a 90 gramas de peso, mantidos em cativeiro. Todos eram convencionais (holoxênicos) e aparentados entre si. Os animais foram alojados individualmente em caixas plásticas, forradas com maravalha de *pinus* e ficando em contato direto com a forração. Forneciam-se aos animais fibras de madeira e tiras de papel para fazer ninhos, de acordo com os preceitos de enriquecimento ambiental de BURKE (1992) e WOLFENSOHN e LLOYD (1995). Foram-lhes fornecidas água *ad libitum* e rações comerciais³, com os seguintes parâmetros:

Proteína bruta (mínimo)	14,2%	Vitamina A	5.000 UI/kg
Extrato etéreo (mínimo)	10,8%	Vitamina C	35 mg/kg
Matéria fibrosa (máximo)	8,4%	Vitamina E	10 mg/kg
Cálcio (máximo)	0,2%	Ácido pantotênico	5 mg/kg
Fósforo (mínimo)	0,16%		

Essas rações compunham-se basicamente de grãos de fabáceas e poáceas, óleo de soja e de fígado de bacalhau, derivados de carne e um *premix* vitamínico. Não era especificado se as vitaminas (especialmente a E) eram naturais ou sintéticas. Segundo informações do fabricante, as rações não continham conservantes ou corantes. Os aditivos contidos na ração eram aprovados para uso na Comunidade Econômica Européia.

³ Premium Menu für Hamster®, Vitakraft Werke, Bremen, Alemanha.

Kräcker®, Vitakraft Werke, Bremen, Alemanha

Setenta por cento da dieta dos animais se compunha dessas rações. Os restantes 30% consistiam em vegetais frescos.

A sala onde os animais ficaram alojados foi mantida sob condições naturais de temperatura e luminosidade. Em vista dos hábitos noturnos dos hamsters, as experimentações foram realizadas à noite.

3.2 INDUÇÃO DAS LESÕES

Para a indução das lesões, empregaram-se 21 animais. Os animais foram submetidos à anestesia geral com cloridrato de xilazina⁴, na dose de 10 mg/kg, e cloridrato de quetamina⁵, na dose de 150 mg/kg, como recomendado por PAYTON *et al.* (1993). As faces laterais das coxas direita e esquerda do animal foram depiladas, e as contusões foram causadas por pinça de Kocher, de 18 cm,⁶ aplicada diretamente à pele. A pinça foi fechada ao primeiro estalo durante 120 segundos. A operação foi então repetida na coxa contralateral, o que resultou em lesões simétricas. Para garantir a uniformidade das lesões, a mesma pinça foi usada em todos os animais. A figura 6 ilustra a técnica empregada.

⁴ Coopazine, Coopers Brasil Ltda, Cotia, S. Paulo, Brasil.

⁵ Ketamina 50, Holliday Scott S/A, Buenos Aires, Argentina.

⁶ Pinça hemostática de Kocher, EDLO, Rio Grande do Sul, Brasil.

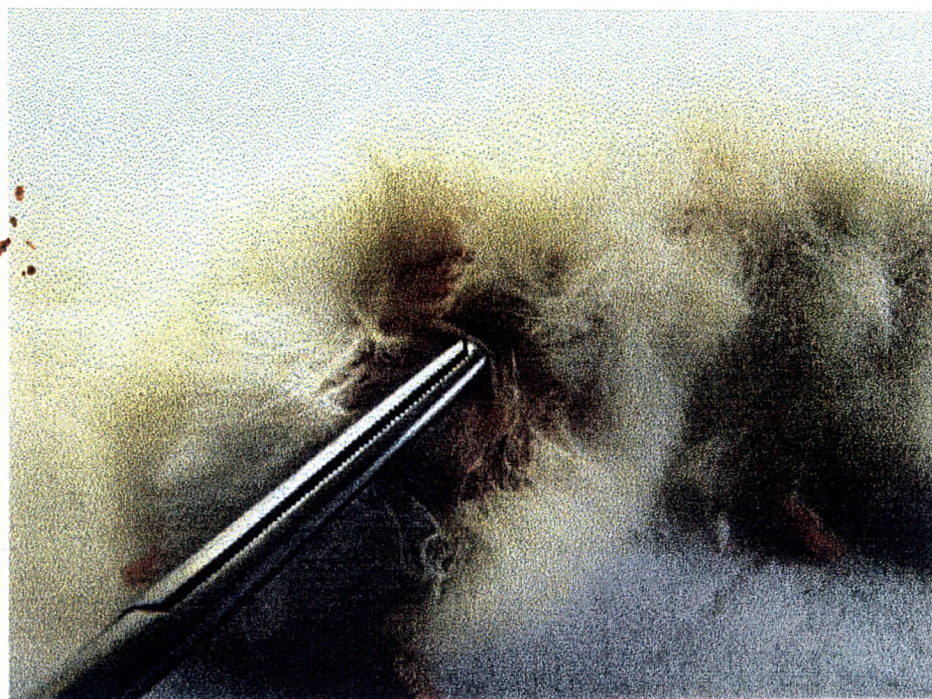


FIGURA 6. Indução da contusão experimental em hamster (*Mesocricetus auratus*).

O lado a ser tratado foi escolhido por sorteio, sendo o outro usado como controle. Iniciou-se o tratamento uma hora após a indução das lesões. O gel de escina foi espalhado sobre a lesão em uma camada fina, a cada 12 horas. Não foi feita massagem após a aplicação do gel.

3.3 AÇÃO DO GEL DE ESCINA SOBRE A PELE ÍNTEGRA

Para se determinar o efeito do gel de escina sobre pele intacta, empregaram-se 11 animais. O método utilizado foi o seguinte. A pele dos animais foi mantida íntegra, e nem sequer foi feita depilação. O gel de escina foi espalhado na face lateral de uma coxa escolhida por sorteio. A coxa contralateral não recebeu gel e serviu como controle. As aplicações eram feitas a cada 12 horas, durante seis dias.

3.4 CONTROLE DA DOR E OBSERVAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Os animais foram observados quanto à exibição de prováveis sinais de dor, intoxicação e desconforto, de acordo com parâmetros sugeridos por WILLIAMS e OLSEN (1984), MONTGOMERY (1987), MORTON (1987), DUBNER (1987) e CAMPOS *et al.* (1997). Os sinais em questão eram: depressão, letargia, lambedura, desconforto local ao toque, anorexia, perda de peso, automutilação, postura anormal, cianose, icterícia, epífora, opacidade corneal, salivação, taquipnéia, perturbação do ritmo circadiano, dor abdominal, ataxia, desidratação, alteração da cor da urina, poliúria, hematúria, diarreia, hematoquezia, coma, convulsões e paralisia. Quando algum destes sinais estava presente, era anotado e tabulado.

3.5 ACOMPANHAMENTO E REGISTRO DA PROGRESSÃO DAS LESÕES

A espessura da pele e subcutâneo do animal na região lesada foi medida diariamente com paquímetro. As medições de espessura foram feitas em três pontos, sendo um ponto central e dois próximos às bordas. A seguir calculou-se a média aritmética das espessuras dos três pontos. A primeira medida foi tomada imediatamente antes da provocação da lesão, registrando a espessura da pele intata. Uma hora após a provocação da lesão, fez-se outra medida de espessura, seguida por outra 12 horas após a lesão. As medidas seguintes foram tomadas a cada 12 horas, abrangendo um período de oito dias (192 horas).

Os contornos das lesões foram registrados a cada 24 horas em uma transparência aplicada diretamente sobre elas, de modo a permitir a mensuração e o estudo da área do ferimento. A área da lesão foi calculada como a área de uma elipse. A contusão foi

considerada curada quando do desaparecimento do edema, dos sinais de contusão e de eventuais soluções de continuidade. O tratamento da lesão foi interrompido por ocasião da cura. O fenômeno da descamação cutânea não foi tomado como critério de cura da lesão.

Anotaram-se os tempos para a cura de cada lesão, bem como o tempo de surgimento de cada alteração inflamatória e a severidade dos sinais.

No segundo grupo de controle, a pele foi observada, e as alterações ocorridas foram anotadas, bem como o seu tempo de surgimento.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados e a significância estatística das diferenças entre médias dos lados tratado e controle foi verificada pelo teste *t* de Student (BIER, 1970).

A diferença entre percentagens foi analisada pela teste da área sob curva normal. Empregou-se a tabela de área sob curva normal para, mediante o valor de *Z*, descobrir-se a possibilidade de a diferença ser devida ao acaso.

4. RESULTADOS

Quanto aos sinais de dor e intoxicação, observaram-se apenas três casos de desconforto local ao toque, o que perfaz 14,28% dos animais submetidos à contusão experimental.

Cumpre notar, porém, a ocorrência de uma morte durante a experimentação. A necropsia revelou a existência de volvo intestinal.

Na Tabela 3, são apresentados os sinais observados nos animais, bem como sua frequência. Esta é representada graficamente na figura 8.

Tabela 3. Frequência dos sinais observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

Lesão	Controle		Tratado	
	Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
Hiperemia	21	100	21	100
Hemorragia subcutânea	9	42,85	11	52,38
Necrose	6	28,57	14	66,6
Descamação	16	76,19	17	80,95

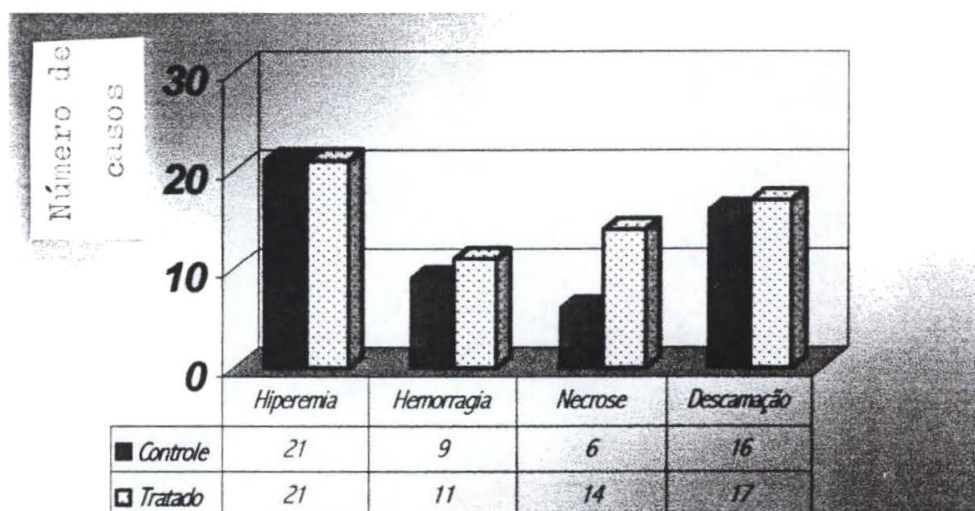


FIGURA 8. Frequência dos sinais observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

O primeiro sinal a ser observado era a hiperemia (figura 9). Sucediam-lhe as hemorragias subcutâneas, que se traduziam como petéquias ou equimoses (figura 10).



FIGURA 9. Hiperemia no sítio de contusão experimental em hamster (*Mesocricetus auratus*).



FIGURA 10. Hemorragia subcutânea no sítio de contusão experimental em hamster (*Mesocricetus auratus*).

A necrose cutânea, que sobrevinha a seguir, era superficial. Sob a escara formada, havia abundante tecido de granulação. Após o desprendimento da escara, a pele era encontrada cicatrizada. A figura 11 ilustra a ocorrência da necrose cutânea.



FIGURA 11. Necrose cutânea em hamster (*Mesocricetus auratus*) submetido à contusão experimental.

A descamação cutânea era discreta e muito superficial. A figura 12 ilustra o fenômeno.



FIGURA 12. Descamação cutânea observada em hamster (*Mesocricetus auratus*) submetidos à contusão experimental.

A análise estatística das frequências dos sinais está na tabela 4.

Tabela 4. Resultados do teste da área sob a curva normal para a diferença entre as frequências dos fenômenos observados nos lados tratado e controle em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação
p'	1	0,48	0,55	0,78

q'	0	0,52	0,45	0,22
$\sigma_{(p1-p2)}$	0,22	0,22	0,24	0,41
Z	0	0,42	1,57	-0,34
%	50	66,27	94,17	36,69

As tabelas 5 e 6 apresentam o tempo médio para o surgimento dos principais sinais nos lados controle e tratado. Na tabela 7, figura a análise estatística da variação temporal entre os grupos tratado e controle. A tabela 8 apresenta os resultados do teste t de Student. A figura 13 representa graficamente os dados das tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Tempo médio, em horas, de surgimento dos fenômenos ocorridos em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental (lado controle).

Animal	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação
1	1	1	36	—
2	1	24	48	72
3	1	—	—	84
4	1	1	48	156
5	1	1	36	168
6	1	24	—	96
7	1	—	—	96
8	1	1	—	—
9	1	—	—	96
10	1	12	48	120
11	1	24	—	108
12	1	—	—	72
13	1	48	—	—
14	1	—	—	96
15	1	—	—	72
16	1	—	—	—
17	1	—	—	72
18	1	—	—	120
19	1	—	—	108
20	1	—	—	—
21	1	—	60	108

Tabela 6. Tempo médio, em horas, de surgimento dos fenômenos observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental (lado tratado).

Animal	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação
--------	-----------	------------	---------	------------

1	1	—	24	—
2	1	12	60	84
3	1	—	48	84
4	1	12	48	180
5	1	—	24	180
6	1	—	—	96
7	1	24	72	96
8	1	1	24	96
9	1	—	—	120
10	1	12	48	108
11	1	24	48	—
12	1	—	—	—
13	1	—	—	84
14	1	—	—	108
15	1	—	72	—
16	1	—	72	96
17	1	36	—	108
18	1	24	48	120
19	1	12	96	120
20	1	—	72	108
21	1	1	—	108

Tabela 7. Análise de variância da diferença dos tempos médios de surgimento, nos lados tratado e controle, dos sinais observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental

	Controle				Tratado			
	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação
Média	1,00	16,87	46,00	102,75	1,00	14,45	32,43	105,33
Desvio-padrão	0,00	16,47	9,03	27,53	0,00	11,42	30,37	38,07
Variância	0,00	271,55	81,60	758,11	0,00	130,47	922,66	1449,41

Tabela 8. Resultados do teste t de Student para a diferença entre os tempos médios de surgimento dos sinais observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

	Hiperemia		Hemorragia		Necrose		Descamação	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Soma	21	21	159	136	276	756	1644	1896
Média	1,00	1,00	14,45	15,11	46,00	54,00	102,75	105,33
Soma dos Quadrados	21	21	3603	4180	13104	46800	224352	181008

Quadrado da soma	441	441	25281	18496	76176	571536	3594816	2702736
$\Sigma(x-x)^2$	0,00	0,00	794,00	1681,95	408,00	4723,43	12892,23	12087,00
S'	0,00		7,86		11,32		24,98	
Σ	0,00		2,42		3,49		7,7	
T	-		0,27		2,29*		0,33	

*estatisticamente significativo para $p < 0,05$

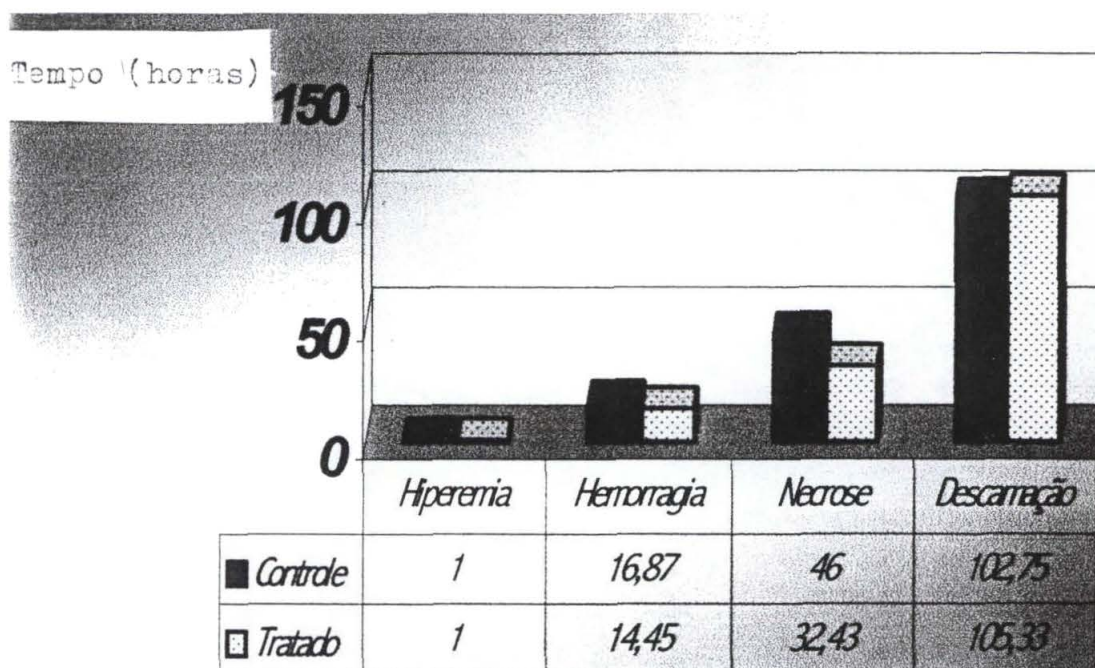


FIGURA 13. Tempo médio, em horas, de surgimento dos sinais clínicos em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

Nas tabelas 9 e 10 está o tempo de duração dos sinais. Apresenta-se na tabela 11 a análise estatística da variação temporal entre os grupos tratado e controle. Os resultados do teste t de Student estão na tabela 12, e a figura 14 mostra graficamente os tempos médios de duração das lesões nos lados tratado e controle.

Tabela 9. Tempo médio, em horas, de duração dos sinais observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental (lado controle).

Animal	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação
1	131	59	96	—
2	131	24	60	60
3	131	—	—	24
4	155	35	144	24
5	191	35	48	48
6	155	132	—	48
7	191	—	—	48
8	191	191	—	—
9	167	—	—	72
10	167	156	120	48
11	179	156	—	72
12	167	—	—	96
13	179	—	—	—
14	179	132	—	84
15	167	—	—	84
16	167	—	—	—
17	179	—	—	84
18	191	—	—	72
19	143	—	—	48
20	119	—	—	—
21	119	—	72	24

Tabela 10. Tempo médio, em horas, de duração dos sinais observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental (lado tratado).

Animal	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação
1	95	—	84	—
2	119	48	48	36
3	83	—	48	24
4	191	36	144	12
5	179	24	120	12
6	155	—	—	60
7	167	24	72	72
8	167	24	256	84
9	119	—	—	48
10	47	36	96	24
11	179	12	132	—
12	167	—	—	—
13	167	—	—	72
14	167	—	—	48

15	155	—	84	—
16	143	—	72	48
17	179	120	—	60
18	191	144	144	60
19	95	120	60	60
20	95	—	36	24
21	95	96	—	12

Tabela 11. Análise estatística da diferença dos tempos médios de duração, nos lados tratado e controle, de sinais observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

	Controle				Tratado			
	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação	Hiperemia	Hemorragia	Necrose	Descamação
Média	161,85	92,00	77,14	55,04	140,71	53,91	93,25	43,76
Desvio	24,17	68,20	47,92	26,51	41,67	47,57	58,94	24,35
Padrão								
Variância	584,22	4652,00	2297,14	703,05	1736,91	2263,71	3474,60	592,94

Tabela 12. Resultado do teste t de Student para a diferença dos tempos médios de duração, nos grupos tratado e controle, dos sinais observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental

	Hiperemia		Hemorragia		Necrose		Descamação	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Soma	3399,00	2955,00	920,00	647,00	540,00	1492,00	936,00	744,00
Média	161,85	140,71	92,00	53,91	77,14	93,25	55,04	43,76
Soma dos Quadrados	561837	450549	126508	59785	55540	191248	62784	42048
Quadrado da soma	115553201	8732025	846400	418609	291600	2226064	876096	553536
$\Sigma(x-x)^2$	4940696,38	34738,28	32463,55	39851,23	41654,29	85244,96	21065,14	15689,14
S'	352,68		42,51		56,32		30,31	
σ	108,84		13,12		17,38		9,35	
T	0,19		2,90**		0,92		1,20	

** Significativo para $p < 0,01$

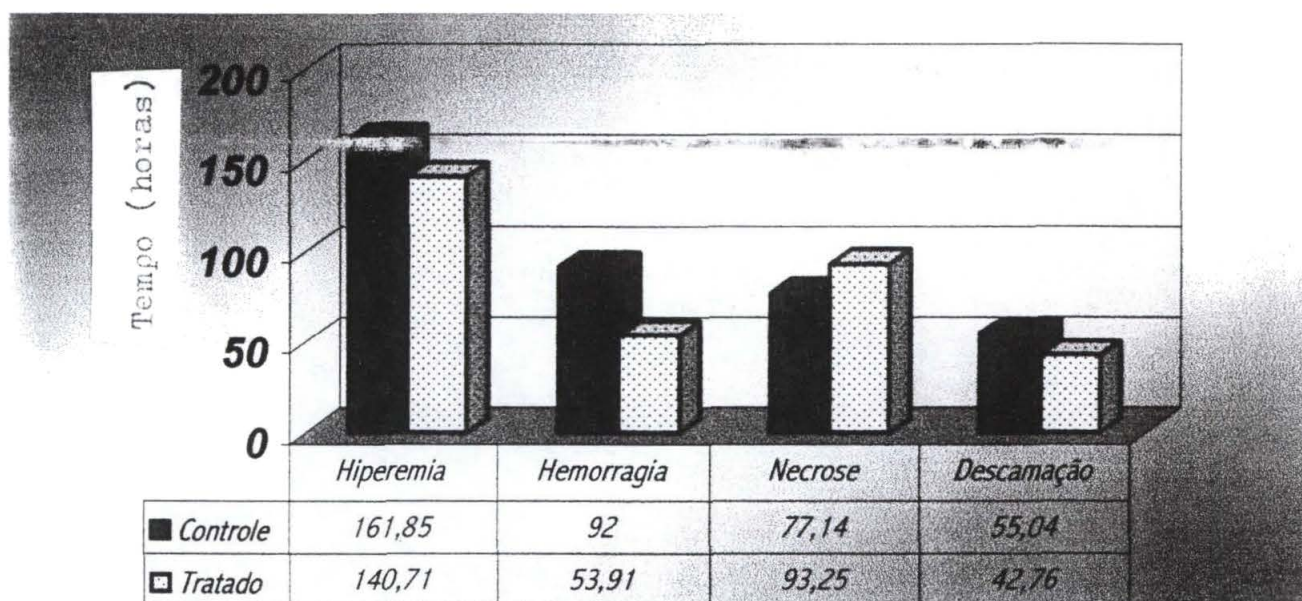


FIGURA 14. Tempos médios de duração dos sinais clínicos observados em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental

As lesões observadas no grupo de animais expostos ao gel de escina pela pele íntegra resumem-se a um caso de descamação cutânea muito discreta, observado no lado tratado de um animal após 5,5 dias (132 horas) de tratamento.

As tabelas 13 e 14 apresentam a variação da área da lesão durante a experimentação nos lados controle e tratado. A análise estatística desta variação aparece na tabela 15. Os dados expressos nas tabelas 13 e 14 são mostrados graficamente e comparados na figura 15.

Tabela 13. Área média da lesão, em milímetros quadrados, no lado controle, em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

Animal	Tempo (horas)									
	1	24	48	72	96	120	144	168	192	216
1	99,7	90,6	38,2	31,2	11,3	0	0	0	0	0
2	62,2	53,7	46,7	23,5	18,1	0	0	0	0	0
3	60,5	43,1	39,3	29,8	12,5	0	0	0	0	0
4	98,1	82,4	56,5	44	27,5	23,5	23,5	0	0	0
5	82,4	62,8	39,3	38,4	33	33	23,5	17,8	7,8	0
6	63,6	60,2	44,17	38,4	33,1	33,1	28,2	12,5	5,8	0
7	38,4	38,4	33,1	28,25	25,1	21,9	19,6	11,7	5,8	0
8	82,4	62,8	44,17	38,4	33,1	33,1	19,6	11,7	5,8	0
9	33,17	19,6	19,6	19,6	12,5	5,8	5,8	0	0	0
10	28,25	28,25	28,25	28,25	19,6	12,5	5,8	0	0	0
11	63,6	60,2	38,4	38,4	28,5	19,6	11,7	5,8	0	0
12	63,6	44	33,1	28,25	19,6	11,7	5,8	0	0	0
13	38,4	38,4	38,4	33,1	28,2	28,2	28,2	12,5	5,8	0
14	78,5	38,4	38,4	33,1	33,1	28,2	12,5	5,8	0	0
15	38,4	38,6	38,4	33,1	28,2	28,2	12,5	5,8	0	0
16	33,17	28	28,25	25,1	19,6	12,5	5,8	5,8	0	0
17	78	78	78	78	38,4	33,1	28,2	12,5	0	0
18	78	78	78	78	38,4	28,2	28,2	12,5	0	0
19	100,5	100,5	100,5	87,9	78,5	76,9	47,1	23,5	0	0
20	82,4	62,8	38,4	33	17,8	7,8	0	0	0	0
21	38,4	38,6	38,4	28,2	12,5	5,8	0	0	0	0

Tabela 14. Área média da lesão, em milímetros quadrados, no lado tratado, em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

Animal	Tempo (horas)									
	1	24	48	72	96	120	144	168	192	216
1	155,5	91,9	40,8	8	1	0	0	0	0	0
2	105,2	58,4	50,5	36,4	30,8	22	0	0	0	0
3	84,8	51,2	31,4	28,2	22	0	0	0	0	0
4	87	84,8	82,4	55	55	34,5	31,4	20,4	20,4	0
5	87	54,2	41,2	36,4	36,4	27,5	23,5	23	23	0
6	56,9	39,2	39,2	39,2	25,1	25,1	15,5	0	0	0
7	78,5	62,6	56,9	56,9	56,9	39,2	25,1	15,5	0	0
8	78,5	78,5	56,9	56,9	56,9	39,2	39,2	15,5	0	0
9	78,5	78,5	31,4	28,2	20,4	0	0	0	0	0
10	78,5	78,5	78,5	78,5	78,5	31,4	23	0	0	0
11	56,9	56,9	56,9	56,95	56,9	39,2	23	11,6	0	0

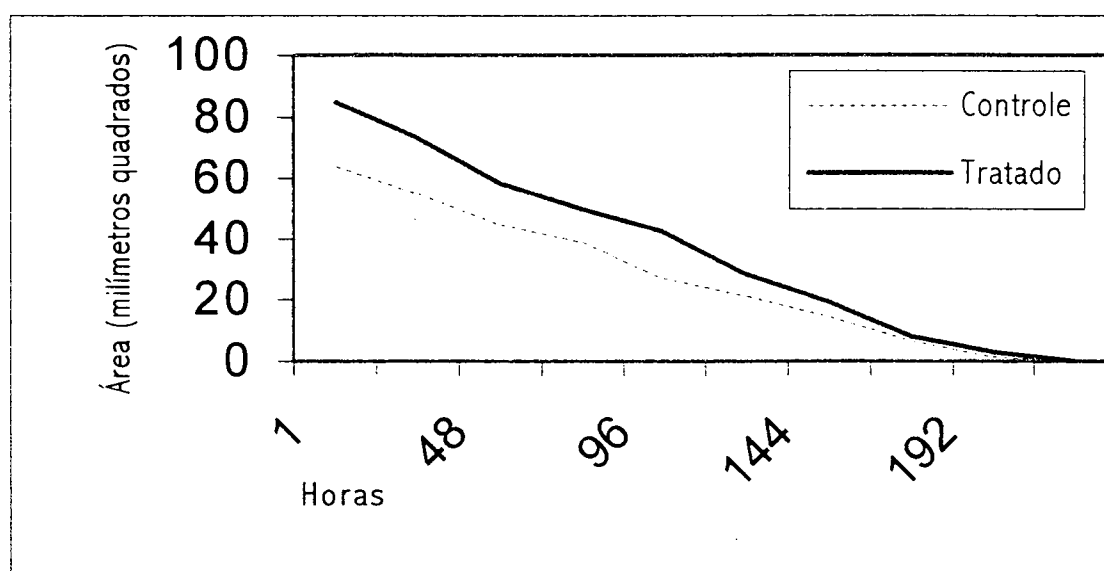


FIGURA 15. Área média, em mm², da lesão em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

As tabelas 17 e 18 apresentam a variação da espessura da lesão nos grupos controle e tratado respectivamente. A análise de variância aparece na tabela 19. A tabela 20 apresenta os resultados do teste t de Student para a espessura da lesão. Os dados expressos nas tabelas 17 e 18 são mostrados graficamente e comparados na figura 16.

Tabela 17. Variação da espessura média da lesão, em milímetros, no lado controle, em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

	íntegra	Tempo (horas)																
		1	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192
1	0,7	1,6	1,4	1,4	1,33	1,15	1,03	1,01	0,95	0,95	0,81	0,66	0,6	0,6	0,6	0,6	0,67	0,6
2	0,6	1,03	1,16	1,18	1,36	1,26	1,08	0,93	0,88	0,88	0,81	0,76	0,66	0,66	0,66	0,66	0,6	0,66
3	0,65	0,81	1,06	1,1	0,9	0,9	0,88	0,88	0,78	0,78	0,73	0,68	0,68	0,66	0,66	0,6	0,67	0,66
4	0,76	0,88	1,06	1,46	1,46	1,41	1,45	1,56	1,53	1,5	1,46	1,46	1,03	0,85	0,81	0,84	0,8	0,75
5	0,73	0,86	1,0	1,15	1,3	1,3	1,43	1,2	1,13	1,15	0,92	0,76	0,8	0,76	0,75	0,7	0,7	0,7
6	0,73	1,05	1,25	1,36	1,36	1,36	1,3	1,1	1,2	1,2	1,26	1,26	1,2	0,96	0,83	0,75	0,75	0,75
7	0,75	1,18	1,28	1,35	1,26	1,26	1,16	1,11	1,1	1,2	1,16	1,2	1,1	0,91	0,85	0,8	0,78	0,75
8	0,62	0,75	0,82	0,85	1,43	1,36	1,3	1,2	0,98	1,0	1,0	0,95	0,9	1,0	0,95	0,86	0,8	0,75
9	0,75	0,93	1,13	1,13	0,9	0,93	0,96	1,0	1,0	0,86	0,8	0,9	0,83	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
10	0,8	0,8	1,06	1,36	1,1	0,93	0,96	0,94	0,96	0,93	0,96	0,96	0,86	0,76	0,78	0,8	0,8	0,8
11	0,6	0,83	0,86	0,96	1,0	1,3	1,1	1,2	1,13	1,3	1,0	1,06	0,86	0,93	0,9	0,8	0,7	0,65
12	0,7	0,83	1,0	1,06	1,33	1,01	1,2	1,16	1,16	1,1	1,1	0,86	0,9	0,93	0,88	0,8	0,75	0,7
13	0,65	0,9	0,9	1,06	1,0	1,1	1,12	0,96	1,0	1,03	1,03	0,93	0,9	0,93	0,86	0,8	0,75	0,66
14	0,6	0,7	1,0	1,03	1,0	0,96	1,0	1,03	1,06	0,93	0,86	0,93	0,83	0,9	0,93	0,86	0,75	0,65
15	0,8	0,9	1,0	1,4	1,3	1,33	1,1	1,06	1,0	1,0	0,96	0,9	0,88	0,9	0,86	0,8	0,8	0,8
16	0,7	1,0	1,2	1,2	1,16	1,16	1,16	0,96	1,03	1,0	0,9	0,96	0,86	0,76	0,7	0,7	0,7	0,7
17	0,65	0,75	0,9	1,2	1,0	0,91	1,0	1,03	0,96	0,96	1,0	0,96	0,93	0,8	0,8	0,73	0,7	0,65
18	0,7	1,03	1,0	1,06	1,3	1,1	1,1	1,2	1,0	1,13	1,0	1,0	1,0	1,0	0,86	0,86	0,7	0,7
19	0,8	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	0,96	1,0	1,0	0,96	0,96	0,9	0,86	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
20	0,7	0,9	1,0	0,96	0,96	0,96	0,96	0,88	0,88	0,83	0,83	0,75	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
21	0,7	0,9	1,13	1,2	1,1	1,0	0,93	0,93	0,86	0,8	0,8	0,76	0,76	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7

Tabela 18. Variação média da espessura da lesão, em milímetros, no lado tratado, em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

Animal	Pele íntegra	Tempo (horas)																
		1	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	192
1	0,63	1,46	1,05	0,96	0,85	0,85	0,75	0,75	0,7	0,63	0,61	0,66	0,66	0,6	0,66	0,6	0,6	0,6
2	0,7	1,26	1,65	1,48	1,48	1,21	1,15	1,0	0,93	0,85	0,85	0,71	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
3	0,7	0,81	0,88	0,82	0,83	0,83	0,75	0,75	0,65	0,65	0,68	0,63	0,63	0,6	0,65	0,6	0,6	0,6
4	0,7	0,86	0,85	0,98	1,05	1,23	1,06	1,06	0,96	1,05	1,01	1,0	0,88	0,81	0,85	0,8	0,75	0,7
5	0,71	0,85	0,85	1,13	1,2	1,36	1,46	1,33	1,23	1,18	1,03	0,8	0,8	0,8	0,85	0,8	0,75	0,7
6	0,73	1,01	1,5	1,26	1,13	1,16	1,1	1,01	1,06	1,13	1,1	0,83	0,81	0,83	0,8	0,8	0,7	0,7
7	0,7	1,06	1,06	0,96	1,06	1,1	1,33	1,3	1,1	1,1	1,03	0,96	0,96	0,9	0,85	0,8	0,7	0,7
8	0,62	0,75	0,81	1,0	0,9	0,9	0,9	0,93	0,8	0,86	0,9	0,9	0,76	0,8	0,8	0,7	0,65	0,6
9	0,75	1,03	0,93	0,9	0,8	0,85	0,85	0,9	0,9	0,73	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
10	0,8	1,0	0,86	1,16	1,1	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,8	0,83	0,83	0,81	0,8	0,8	0,8	0,8
11	0,6	0,8	0,86	1,06	1,0	1,2	0,96	1,1	1,0	1,0	0,9	0,9	0,8	0,83	0,8	0,7	0,65	0,6
12	0,7	0,83	1,03	1,0	1,3	1,01	0,9	0,96	0,96	0,9	0,78	0,86	0,88	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7
13	0,65	0,9	1,0	1,0	0,96	1,1	0,9	0,96	0,9	0,96	0,86	0,83	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
14	0,7	0,83	1,0	0,9	0,95	1,0	0,93	0,96	0,96	0,9	0,93	0,86	0,76	0,85	0,8	0,7	0,7	0,7
15	0,8	1,0	1,03	1,06	1,06	1,23	1,23	1,2	1,1	1,1	0,96	0,9	0,81	0,83	0,8	0,8	0,8	0,8

16	0,7	1,4	1,4	1,3	1,16	1,3	1,1	1,16	1,13	1,1	1,06	0,96	0,86	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
17	0,65	0,86	0,9	1,2	1,0	1,0	0,96	0,93	0,96	1,0	0,96	0,93	0,96	0,76	0,7	0,65	0,65	0,65
18	0,7	0,86	0,96	1,0	1,06	0,9	1,0	1,0	1,1	0,93	0,96	0,9	0,83	0,83	0,83	0,76	0,7	0,7
19	0,8	1,0	0,93	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03	1,1	1,03	1,0	0,9	0,86	0,8	0,8	0,8	0,8
20	0,7	0,93	1,0	0,83	0,85	0,85	0,85	0,85	0,86	0,85	0,85	0,8	0,75	0,75	0,7	0,7	0,7	0,7
21	0,75	0,9	0,93	0,93	0,88	0,86	0,83	0,83	0,83	0,83	0,8	0,8	0,78	0,78	0,75	0,75	0,75	0,75

Tabela 19. Análise de variância, nos grupos tratado e controle, da espessura da lesão em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental

Horas	Controle			Tratado		
	Média	Desvio-padrão	Variância	Média	Desvio-padrão	Variância
0	0,69	0,06	0,004	0,70	0,05	0,003
1	0,93	0,19	0,03	0,97	0,19	0,03
12	1,05	0,14	0,02	1,02	0,22	0,04
24	1,16	0,17	0,02	1,04	0,16	0,02
36	1,16	0,18	0,03	1,03	0,16	0,02
48	1,12	0,17	0,03	1,04	0,16	0,02
60	1,10	0,15	0,02	1,00	0,18	0,03
72	1,06	0,15	0,02	0,99	0,15	0,02
84	1,02	0,15	0,02	0,95	0,14	0,02
96	1,02	0,17	0,03	0,94	0,15	0,02
108	0,96	0,17	0,03	0,89	0,12	0,01
120	0,93	0,19	0,03	0,84	0,1	0,01
132	0,86	0,14	0,02	0,80	0,08	0,007
144	0,82	0,12	0,01	0,77	0,07	0,005
156	0,79	0,09	0,009	0,76	0,06	0,003
168	0,75	0,07	0,006	0,73	0,06	0,004
180	0,73	0,05	0,002	0,7	0,06	0,004
192	0,70	0,05	0,003	0,70	0,06	0,004

Tabela 20. Resultados do teste t de Student para a diferença entre as médias de espessura da lesão, em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

Horas	Controle					Tratado					S'	σ	T
	Σ	Média	SQ	QS	$S(x_1-x_1)$	Σ	Média	SQ	QS	$S(x_2-x_2)$			
0	14,69	0,69	10,36	215,79	0,08	14,79	0,70	10,47	218,74	0,05	0,05	0,01	1,0
1	19,53	0,93	18,89	381,42	0,72	20,4	0,97	20,54	416,16	0,72	0,18	0,05	-0,08
12	22,21	1,05	23,90	493,28	0,42	21,48	1,02	22,96	461,39	0,87	0,17	0,05	0,6
24	24,47	1,16	29,09	598,78	0,57	21,96	1,04	23,48	482,24	0,51	0,16	0,05	2,4*
36	24,55	1,16	29,37	602,70	0,67	21,65	1,03	22,86	468,72	0,54	0,17	0,05	2,6†
48	23,69	1,12	27,33	561,21	0,60	21,93	1,04	23,45	480,92	0,54	0,16	0,05	1,6
60	23,18	1,10	26,09	537,31	0,50	21	1,00	21,65	441,00	0,65	0,16	0,05	2,0

36	24,55	1,16	29,37	602,70	0,67	21,65	1,03	22,86	468,72	0,54	0,17	0,05	2,6‡
48	23,69	1,12	27,33	561,21	0,60	21,93	1,04	23,45	480,92	0,54	0,16	0,05	1,6
60	23,18	1,10	26,09	537,31	0,50	21	1,00	21,65	441,00	0,65	0,16	0,05	2,0
72	22,34	1,06	24,25	499,07	0,48	20,97	0,99	21,42	439,74	0,48	0,15	0,04	1,75
84	21,59	1,02	22,67	466,12	0,47	20,12	0,95	19,67	404,81	0,39	0,14	0,04	1,75
96	21,49	1,02	22,61	461,82	0,61	19,81	0,94	19,16	392,43	0,47	0,16	0,05	1,6
108	20,35	0,96	20,31	414,12	0,59	18,85	0,89	17,25	355,32	0,33	0,15	0,04	1,75
120	19,6	0,93	19,04	384,16	0,74	17,81	0,84	15,31	317,19	0,29	0,16	0,04	2,25*
132	18,14	0,86	16,08	329,05	0,41	16,86	0,80	13,68	284,25	0,14	0,11	0,03	2,0
144	17,26	0,82	14,47	297,90	0,28	16,34	0,77	12,83	266,99	0,11	0,09	0,03	1,66
156	16,63	0,79	13,35	276,55	0,18	16,14	0,76	12,48	260,49	0,07	0,07	0,02	2,5‡
168	15,91	0,75	12,17	253,12	0,11	15,36	0,73	11,31	235,92	0,07	0,06	0,02	1,0
180	15,37	0,73	11,30	236,23	0,05	14,7	0,7	10,37	216,09	0,08	0,05	0,09	0,33
192	14,88	0,70	10,60	221,41	0,05	14,1	0,70	10,01	198,91	0,54	0,25	0,07	0,0

SQ: soma dos quadrados

QS: quadrado da soma

Σ : soma

* estatisticamente significativo para $p < 0,05$

‡: estatisticamente significativo para $p < 0,02$

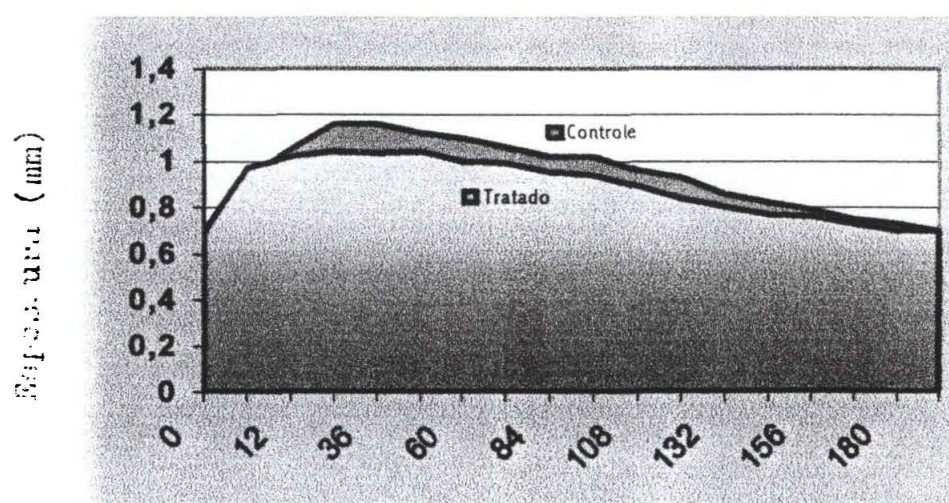


FIGURA 16. Variação, de acordo com o tempo decorrido, da espessura da lesão, em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

Tabela 21. Tempos médios para cura da lesão, em horas, nos lados controle e tratado, em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

Animal	Sexo	Tempo (horas)	
		Tratado	Controle
1	F	96	132
2	F	120	132
3	F	108	132
4	F	192	156
5	M	192	192
6	M	156	192
7	M	168	192
8	M	180	192
9	F	108	168
10	M	144	168
11	M	180	180
12	M	168	168
13	M	160	204
14	F	168	180
15	F	156	168
16	M	144	192
17	F	180	180
18	F	192	192
19	M	156	192
20	M	108	132
21	M	120	132

Tabela 22. Análise de variância, nos grupos tratado e controle, dos tempos médios de cura da lesão em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental

	Tratado	Controle
Soma	3196	3576
Média	152,19	170,28
Desvio-padrão	30,94	24,773
Variância	957,56	613,71

Tabela 23. Resultados do teste t de Student para a diferença entre os tempos médios de cura da lesão, nos lados tratado e controle, em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental.

	Tratado	Controle
Soma	3196	3576
Média	152,19	170,28
Soma dos Quadrados	505.552	621.216
Quadrado da Soma	10.214.416	12.787.776
$\Sigma(x-x)^2$	19.151,23	12.274,28
S'		28,09
Σ		8,66
T		2,08*

* Significativo a $p < 0,05$.

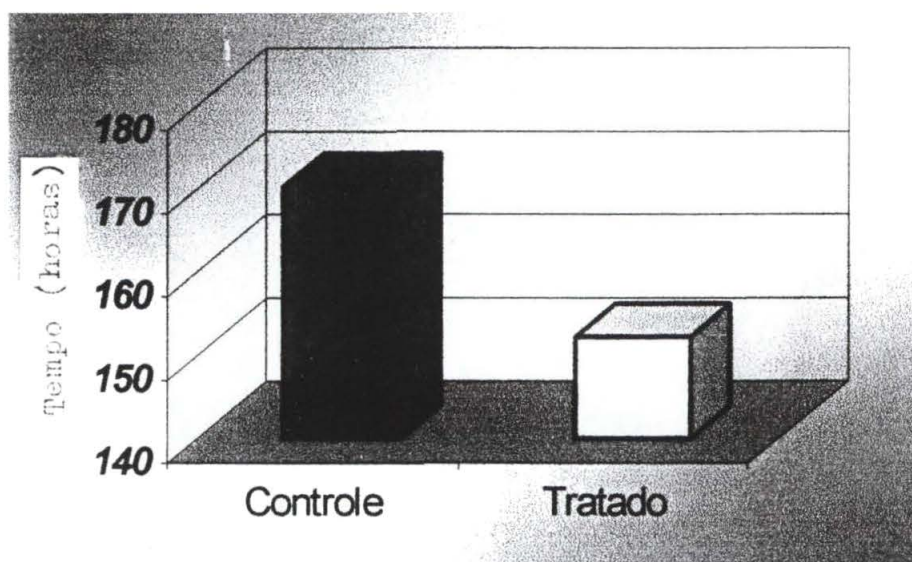


FIGURA 17. Tempos médios, em horas, para cura das lesões em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos a contusão experimental

5. DISCUSSÃO

O modelo experimental apresentado no presente trabalho é uma inovação, pois ~~consiste na provocação da inflamação por trauma mecânico~~. O instrumento utilizado — a pinça de Kocher — provoca uma contusão com pequenas soluções de continuidade na pele, simulando uma mordida. Certamente este modelo é muito próximo da realidade, pois o trauma mecânico é muito mais freqüente em clínica do que a injúria química. A capacidade da escina em bloquear a formação do edema foi testada principalmente pelo modelo do edema em membro posterior de rato. Este edema é obtido por injeção de ovalbumina a 2%, dextrano a 2%, carragenina a 0,6%, bradicinina e composto 48/80, além de hialuronidase, serotonina, histamina, Aerosil a 2,5%, caulim a 10%, peçonha de abelha e formalina a 3% (PANIGATI, 1992a; HÄNSEL *et al.*, 1992). Assim se comprovou que o efeito da escina é maior na fase inicial exsudativa da inflamação, e muito pequeno nas fases tardias e na formação do granuloma (PANIGATI, 1992 a; HÄNSEL *et al.*, 1992). A ação anti-exsudativa da escina foi avaliada pelos modelos de peritonite serosa, provocada por injeção de formalina no rato, e pelo azul de Evans no camundongo (ROTHKOPF e VOGEL, 1976). O *Cotton pellet test* também foi empregado para avaliar a ação anti-exsudativa da escina. Este experimento consiste em implantar um chumaço de algodão no subcutâneo de um rato. O algodão absorve o exsudato, e é posteriormente removido e pesado. Comprovou-se que a exsudação nos animais controle é significativamente maior que a exsudação nos ratos tratados com escina (PANIGATI, 1992a). Ainda, as alterações hematológicas causadas pela escina foram estudadas pelo modelo da injeção subcutânea de terebintina em cães (SANTOS e CARVALHO, 1994). No presente trabalho, empregaram-se animais holoxênicos. Há muito se sabe que a ação da microbiota intestinal repercute muito além do trato

gastrointestinal, interferindo até mesmo em fenômenos de rejeição de medula óssea transplantada (HEIDT *et al. apud* VIEIRA e NICOLLI, 1990). Os parâmetros fisiológicos e morfológicos de ratos axênicos diferem sensivelmente daqueles dos ratos holoxênicos (VIEIRA e NICOLLI, 1990). As lesões no miocárdio causadas pela doença de Chagas são muito mais severas em camundongos axênicos do que nos camundongos convencionais; todavia, as lesões de leishmaniose são mais graves nos camundongos convencionais do que nos axênicos (VIEIRA e NICOLLI, 1990). No entanto, possíveis interferências da microbiota intestinal em fenômenos semelhantes àqueles descritos no presente trabalho permanecem uma incógnita.

Empregou-se na forração das caixas a maravalha de *Pinus sp.* POTGIETER e WILKE (1993) advertem que as substâncias orgânicas oriundas da própria árvore, como os ácidos diterpênicos, poderiam influenciar adversamente determinados experimentos, especialmente aqueles que versam sobre biotransformação de drogas. Todavia, nenhuma interferência da maravalha sobre o experimento foi observada.

A composição da dieta seguiu as recomendações de RUCKEBUSCH (1981), WEST (1991) e STOLIKER (1995). A inclusão de vegetais frescos assegurou que não ocorreu fornecimento marginal de vitamina E. As rações comerciais usualmente contêm vitamina E sintética, em virtude do menor custo desta. Todavia, a vitamina E sintética, que é uma mistura racêmica de oito isômeros, tem biodisponibilidade muito menor que a vitamina E natural, que se compõe de um só isômero (PAPAS, 1991). É certo que ratos aproveitam bem tanto a vitamina E natural quanto a sintética. Todavia, a biodisponibilidade da vitamina E natural é muito maior para as ovelhas, pessoas, iguanas, cavalos e antas (PAPAS, 1991).

As opções para controle da dor em roedores são a buprenorfina (WOLFENSOHN e LLOYD, 1995; ABBOTT e BONDER, 1997) e a dipirona (ABBOTT e BONDER, 1997). A primeira não foi empregada no presente trabalho por ser uma droga de difícil obtenção. Quanto à dipirona, é um conhecidíssimo antiinflamatório, e não foi usada no experimento porque fatalmente iria interferir no processo inflamatório do lado controle, bem como no lado tratado. TVERSKOY *et al.* *apud* PASCOE (1997), em um estudo já tornado clássico, comprovaram a prolongada ação da bupivacaína em pessoas, ao usarem este anestésico em infiltrações nas incisões de herniorrafia. A máxima dose empregada por PASCOE (1997) em animais foi de 1 mg/kg. No presente trabalho, injetou-se em cada lesão 0,1 ml de bupivacaína a 0,25%, o que resultou numa dose máxima de 0,83 mg/kg. Parece que a bupivacaína foi efetiva e de ação prolongada também nos hamsters.

Na presente pesquisa, o único sinal de estresse digno de nota foi um discreto desconforto local, observado em três (14,28%) animais. Nenhum sinal de intoxicação foi notado. A questão do estresse é muito importante ao se trabalhar com hamsters. Estes animais são muito sensíveis ao estresse, que é um fator predisponente à enterite proliferativa (THOMLINSON, 1975; FRISK e WAGNER, 1977; WEST, 1991) e à pneumonia (WEST, 1991) que, por sinal, são as doenças mais frequentes nos hamsters (RENSHAW *et al.*, 1975; AMEND *et al.*, 1976).

Não foi observada nenhuma ação aparente do medicamento sobre o lado controle. Isto deve ser devido à baixa tendência do medicamento em se difundir pelo organismo. Tal fato foi verificado por LANG (1974), que, trabalhando com escina tritiada, constatou que 25% da quantidade aplicada por via cutânea em camundongos permanecia na pele. No caso dos ratos, a quantidade retida na pele chegava a 50%. A

escina também se depositava em grande quantidade no subcutâneo e músculos estriados subjacentes. Apenas uma fração mínima (1/20 a 1/100 da concentração muscular no camundongo e 1/50 da concentração muscular no rato) chegava aos órgãos internos. LANG (1974) notou todavia a difusão lateral da escina na pele dos camundongos. Entretanto, há que se notar que LANG (1974) usou solução aquosa de escina. Pode ser que o álcool presente no gel aumente a difusão transcutânea da escina.

Houve uma morte durante a experimentação. A necropsia revelou a ocorrência de volvo intestinal. Este incidente certamente não está ligado ao uso do gel de escina.

No presente experimento, comprovou-se que o gel de escina reduziu a formação de edema no local da lesão. Os prováveis mecanismos pelos quais a escina bloqueia a formação do edema seriam: 1) redução no diâmetro dos poros dos capilares; 2) bloqueio da ação da histamina; 3) vasoconstrição mediada pela $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A necrose de pele ocorreu tanto do lado tratado quanto do controle. Todavia, sua prevalência foi muito maior no lado tratado. Em quase todos os casos a hemorragia subcutânea precedeu a necrose no lado tratado. É muito provável que este fenômeno esteja ligado ao modelo experimental. Presume-se que as lesões deixadas pelos dentes da pinça tenham permitido que o álcool, presente no veículo do gel, tenha alcançado regiões mais profundas da derme e aí desnaturado proteínas das membranas celulares. Talvez mesmo a própria escina, por alterar as características de permeabilidade seletiva da membrana celular, possa ter agravado o processo de necrose, acelerando a destruição de células já danificadas. A escina realmente pode causar necrose de coagulação no tecido subcutâneo quando de injeções extravasculares (JORNAL BRASILEIRO DE MEDICINA, 1995). Quanto à necrose ocorrida no lado controle, é provável que vasos cutâneos tenham sido bloqueados ou pelo trauma em si, ou pelo edema, ou por trombos.

Há que se lembrar também que a escina é vasoconstritora e isto pode ter contribuído para o processo de necrose. Necrose de pele não foi observada em animais cuja pele íntegra foi tratada com o gel de escina. Tampouco foi registrada em animais tratados com o mesmo medicamento devido a contusões de ocorrência natural. De qualquer modo, a redução da permeabilidade vascular promovida pela escina melhora a microcirculação, prevenindo a ulceração (DIEHM *et al.*, 1996) e, certamente, acelerando o processo de reparação. Pode-se observar que, apesar da necrose cutânea, o lado tratado voltou à normalidade antes do controle. É lícito pensar que, neste caso, a necrose cutânea tenha feito o papel de debridamento da lesão. Entre os presumíveis mecanismos pelos quais a escina normaliza a microcirculação, poder-se-iam contar: (1) sua ação anticoagulante e fibrinolítica, que reduziria a formação de trombos e (2) redução da atividade de enzimas lisossomais. É notável que, na Europa, a escina foi usada empiricamente por muitos anos para reduzir a prevalência de complicações tromboembólicas após cirurgias ginecológicas. Entretanto, este procedimento caiu em desuso após sua eficácia ser questionada por vários autores (LIN e FRISHMAN, 1996). Pode-se pensar que a escina acelere o processo de reparação também por aumentar o metabolismo celular ao ativar sistemas enzimáticos. Pode ser lícito esperar que a escina possa reduzir danos causados pelo superóxido e talvez também possa reduzir a ação das proteases.

Observou-se, como último fenômeno da evolução das lesões, o aparecimento de descamação epidérmica, tanto no lado controle quanto no tratado. Presumivelmente, esta descamação estaria associada à própria agressão sobre a pele e não ao uso do gel de escina. Todavia, em um dos animais cuja pele íntegra foi tratada com o medicamento, houve uma discreta descamação similar àquela observada nos animais submetidos à

contusão experimental. Isto impede que se descarte que a escina tenha alguma influência sobre o surgimento do fenômeno descamação, seja por induzir hiperplasia da epiderme (acantose) ou por aumentar temporariamente a velocidade de renovação (*turnover*) das células epidérmicas. PABST e KLEIN (1986) registraram dois casos de descamação cutânea entre 40 atletas cujas contusões foram tratadas com gel de escina sob bandagem oclusiva. Pode ser que a descamação encontrada por estes autores seja devida à bandagem. Sabe-se que o esparadrapo induz acantose e descamação em cães após alguns minutos.

6. CONCLUSÕES

1. O gel de escina, aplicado sobre a pele, não é tóxico para os hamsters.
2. A escina aplicada por via percutânea apresenta ação antiinflamatória local e é efetiva na terapia das contusões em hamsters.
3. O gel de escina, neste modelo experimental, parece provocar necrose superficial da pele nas lesões tratadas. Não se encontrou explicação plausível para tal, todavia este fenômeno parece estar ligado ao modelo experimental.
4. O gel de escina aparenta não acelerar significativamente a velocidade de redução da área lesada após contusão experimental.
5. O tratamento com o gel de escina acelera o processo de reparação das lesões contusas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F. V., BONDER, M. Options for management of acute pain in the rat. *The Veterinary Record*, vol. 140, p. 553-557, 1997.
- ALLEN, D. G., *et al.* *Handbook of veterinary drugs*. J. B. Lippincott, Filadelfia, 1993.
- AMEND, N. K. *et al.* Transmission of enteritis in the Syrian hamster. *Laboratory Animal Science* vol. 26, n. 4, p. 566-572, 1976.
- BAMONTE, F. *et al.* Osservazione tossicologiche sulla somministrazione per via endovenosa di una associazione escina-ciclonamina. *Bolletino Chimico Farmaceutico* vol.115, p. 272-284, 1976.
- BERTI, F., OMINI, C., LONGIAVE, D. The mode of action of aescin and the release of prostaglandins. *Prostaglandins* vol.14, n. 2, p. 241-249, 1977.
- BIER, O. *Bacteriologia e imunologia*. Melhoramentos, S. Paulo, 1970.
- BISHOP, Y. *et al.* *The Veterinary Formulary – handbook of medicines used in veterinary practice*. 3ª edição, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain e British Veterinary Association, Londres, 1993.
- BONACINA, F., PACCHIANO, F. Attività complementare degli antocianosidi in un preparato ad azione antiedemigena e capillaroprotetiva. *Bolletino Chimico Farmaceutico*, vol. 113, p. 540-550, 1974.
- BRITISH PHARMACOPOEA COMMISSION. *British Pharmacopoea (Veterinary)*. Primeira edição, HMSO, Londres, 1993.
- BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Primeira edição, Acribia, Zaragoza, Espanha, 1991.
- BURKE, T. J. Mascotas de bolsillo: una guía para veterinarios sobre roedores y conejos, *Waltham International Focus* vol. 2, n. 3, p. 17-23, 1992.

- CAMPOS, R. O. P. *et al.* Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. *J. Pharm Pharmacol* vol.50, p.1187-1193, 1998.
- CEBO, D. *et al.* Właściwości farmakologiczne frakcji saponinowych otrzymanych z surowców krajowych: *Saponaria officinalis*, *Primula officinalis* i *Aesculus hippocastanum*. *Herba Polonica*, vol. 22, n.2, p. 154-162, 1976.
- CRANE, S. W. Perioperative analgesia. A surgeon's perspective. *Journal of the American Medical Veterinary Association* vol. 191, n.10, p.1254-1257, 1987.
- DE PASCALE, V. *et al.* Azione sulla permeabilità capillare di una associazione escina-ciclonamina. *Bolletino Chimico Farmaceutico* vol. 113, p. 600-613, 1974.
- DIEHM, C. *et al.* Comparison of leg compression stocking and oral horse-chestnut seed extract therapy in patients with chronic venous insufficiency. *The Lancet* vol. 347, p. 292-294, 1996.
- DUBNER, R. Research on pain mechanisms in animals. *Journal of the American Medical Veterinary Association* vol. 191, n.10, p. 1273-1276, 1987.
- FIESER, L. F., FIESER, M. *Química orgánica superior*. Grijalba, México, 1966. 2 Vol.
- FLEITMAN, J., FUJIKI, J. S., LEE, J. C. Triethanolamine. In WADE, A. WELLER, P. J. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Segunda edição, The Pharmaceutical Press, Londres, 1994.
- FRISK, C. S., WAGNER, J. E. Hamster enteritis: a review. *Laboratory Animals* vol. 11, p. 79-85, 1977.
- HAASE, M., MCGINITY, J. W. Carbomer. In WADE, A. WELLER, P. J. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Segunda edição, The Pharmaceutical Press, Londres, 1994.

- HÄNSEL, R. *et al.* *Hagers Handbuch – der pharmazeutischen Praxis. 4. Drogen A-D.* Springer-Verlag, Alemanha, 1992.
- HARGIS, A. M., LIGGITT, H. D. ~~Cytokines and their role in cutaneous injury.~~ In: IHRKE, P. J., MASON, I. S., WHITE, S. D. *Advances in veterinary dermatology. Volume 2.* Pergamon Press, Grã-Bretanha, 1993. 325-352.
- JORNAL BRASILEIRO DE MEDICINA. *Dicionário de especialidades farmacêuticas 95/96.* 24ª edição, Editora de Publicações Científicas, Rio de Janeiro, 1995.
- KARUZA-STOJAKOVIĆ, L., PETRIČIĆ, J., ŠMIT, Z. The total triterpene glycoside content expressed as aescin in horse-chestnut seeds (*Aesculus hippocastanum* L.) during vegetation. *Pharmazie* vol. 46, p. 303, 1991.
- KITCHELL, R. L. Problems in defining pain and peripheral mechanisms of pain. *Journal of the American Medical Veterinary Association* vol. 191, n. 10, p. 1195-1199, 1987.
- KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara 1995/1996.* Guanabara, Rio de Janeiro, 1995.
- KUNZ, K., *et al.* Bioverfügbarkeit von β -Aescin nach oraler Gabe zweier Aesculus-Extrakt enthaltender Darreichungsformen an gesunden Probanden. *Die Pharmazie* vol. 46, p. 145, 1991.
- LANG, W. Untersuchungen zur perkutanen Absorption von ^3H -Aescin bei Maus und Ratte. *Arzneimittel-Forschung (Drug Research)* vol. 24, n. 1, p. 71-76, 1974.
- LEHTOLA, T., HUHTIKANGAS, A. Immunoassay of aescine, a mixture of triterpene glycosides. *Journal of Immunoassay* vol. 11, n. 1, p. 17-30, 1990.
- LEWIS, S. J. Alcohol. In WADE, A. WELLER, P. J. *Handbook of pharmaceutic excipients.* Segunda edição, The Pharmaceutic Press, Londres, 1994.

- LIN, G. I., FRISHMAN, W. H. Use of alternative medicine in treating cardiovascular disease. In FRISHMAN, W. H., SONNENBUCK, E. H. *Cardiovascular pharmacotherapeutics*. McGraw-Hill, EUA, 1996, 987-1003.
- MARGENAU, H. *et al. Biblioteca científica Life — O Cientista*. José Olympio, Rio de Janeiro, 1972.
- MARTÍN, M. J., ALARCÓN, C., MOTILVA, V. Effets de l'aescine et de l'aesculine sur l'excrétion renale d'eau et d'électrolytes chez le rat. *Annales Pharmaceutiques Françaises* vol. 48, n. 6, p. 306-311, 1990.
- MONTGOMERY, C. A. Control of animal pain and distress in cancer and toxicologic research. *Journal of the American Medical Veterinary Association* vol. 191, n. 10, p. 1277-1281, 1987.
- MORRISON, R., BOYD, R. *Química orgânica*. 13ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996.
- MORTON, D. B. Epilogue: summarization of Colloquium highlights from an international perspective. *Journal of the American Medical Veterinary Association* vol. 191, n. 10, p. 1292-1296, 1987.
- NEUMÜLLER, O.-A., BRZITWA, E., PFUNDTNER, R. *Römppps Chemie-Lexicon. Band 6: T-Z*. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 1977.
- NOVELLI, A. *Química orgánica (homocíclica, aromática, heterocíclica)*. Librería El Ateneo Editorial, Buenos Aires, 1959.
- PABST, H., KLEINE, M. W. Prävention und Therapie von Sportverletzungen. Erfahrungen mit einem Aescin-haltigen Gel. *Fortschritte der Medizin* vol. 16, n. 3, p. 44-48, 1986.

PANIGATI, D. Farmacologia dell'escina, saponina dell'*Aesculus hippocastanum* L.

Parte II. Farmacologia dell'escina, Capitolo I. *Bolletino Chimico Farmaceutico* vol. 131, n. 6, p. 242-246, 1992a.

PANIGATI, D. Farmacologia dell'escina, saponina dell'*Aesculus hippocastanum* L.

Parte II. Farmacologia dell'escina, Capitolo II. *Bolletino Chimico Farmaceutico* vol. 131, n. 7, p. 284-293, 1992b.

PAPAS, A. M. Antioxidants. Which one are best for your petfood products? *Petfood Industry* vol. 33, n. 3, p. 8-16, 1991.

PASCOE, P. Local and regional anesthesia and analgesia. *Seminars in Veterinary Medicina and Surgery (Small Animal)*. vol. 12, n. 2, p. 94-105, 1997.

PAYTON, A. J. *et al.* Evaluation of ketamine-xylazine in Syrian hamsters. *The Cornell Veterinarian* vol. 83, p. 153-161, 1993.

PIO CORREA, M. *Dicionário das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Volume 2.* Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984.

POTGIETER, F. J., WILKE, P. I. Laboratory animal bedding and nesting materials for rodents and lagomorphs. The South African situation. *Journal of the South African Veterinary Association* vol. 64, n. 4, p. 144-148, 1993.

QUER, P. F. *Plantas medicinales – el Dioscórides renovado.* Nona edição, Labor, Espanha, 1985.

RENSHAW, H. W. *et al.* A survey of naturally occurring diseases of the Syrian hamster. *Laboratory Animals* vol. 9, n. 3, p. 179-191, 1975.

RICHARSON, M. L., GANGOLLI, S. *The dictionary of substances and their effects.* Royal Society of Chemistry, Londres, 1993.

- ROTHKOPF, M., VOGEL, G. Neue befunde zur Wirksamkeit und zum Wirkungsmechanismus des Rosskastaniensaponin Aescin. *Arzneimittelforschung (Drug Research)* vol. 26, n. 2, p. 225-235, 1976.
- RUCKEBUSCH, Y. *Physiologie — pharmacologie — thérapeutique*. Segunda edição, Maloine, Paris, 1981.
- SANTOS, C. A. M., TORRES, K. R., LEONART, R. *Plantas medicinais* (herbarium, flora et scientia). Scientia et Labor, Curitiba, 1988.
- SANTOS, M. V., CARVALHO, C. B. Variações no hemograma de cães submetidos experimentalmente a processo inflamatório e tratados com escina sódica (Reparil). *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiiana*. Vol. 1, n. 1, p. 49-54, 1994.
- SINGER, C. La ciencia. In BAILEY, C. *El legado de Roma*. Segunda edição, Pégaso, Madrid, 1947. 353-429.
- STOLIKER, H. E. The golden hamster. In _____. *Exotic animals. A veterinary handbook*. Veterinary Learning Systems, Nova Jérsei, EUA, 1995. 14-19.
- TARAYRE, J. P., LAURESSERGUES, H. Étude pharmacologique de quelques substances à visée capillaire. *Annales Pharmaceutiques Françaises* vol. 33, n. 10, p. 467-471, 1975.
- THOMLINSON, J. R. "Wet-tail" in the Syrian hamster: a form of colibacillosis. *The Veterinary Record* vol. 96, p. 42, 1975.
- TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária – uma introdução*. Quinta edição, Roca, S. Paulo, 1998.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. *Normas para apresentação de trabalhos*. 2. Teses, dissertações e trabalhos acadêmicos.

Segunda edição, Curitiba, Editora da UFPR: Governo do Estado do Paraná, 1992. 23p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. ~~Biblioteca Central e Normas para~~
apresentação de trabalhos. 6. Referências bibliográficas. Segunda edição,
Curitiba, Editora da UFPR: Governo do Estado do Paraná, 1992. 43p.

VIEIRA, E. C., NICOLI, J. R. Gnotobiologia — a ciência dos animais limpos. *Ciência Hoje* vol. 11, n. 66, p. 24-30, 1990.

WEST, C. D. Hamsters. In BEYNON, P. H., COOPER, J. E. *Manual of exotic pets.*
BSAVA, Grã-Bretanha, 1991. p. 39-50.

WILLIAMS, M. C., OLSEN, J. D. Toxicity of seeds of three *Aesculus* spp. To chicks
and hamsters. *American Journal of Veterinary Research* vol. 45, n.3, p. 539-542,
1984.

WOLFENSOHN, S., LLOYD, M. *Handbook of laboratory animal management and
welfare.* Segunda edição, Oxford University Press, Grã-Bretanha, 1995.

ZANINI, A. C., *et al.* *Guia de medicamentos 1995.* Atheneu, S. Paulo, 1995.

ERRATA

Na página 5, onde se lê! (MARGENAU et al., 1970), leia-se :
(MARGENAU et al., 1968).

Na página 55, acrescente-se:

BANKS, W. J. Histologia veterinária aplicada. Manole, S. Paulo, 1992.

Na página 56, acrescente-se:

CHREVILLE, N. F. Introdução à patologia veterinária. Manole, S. Paulo, 1994.

Na página 57, acrescente-se:

JONES, T. C., HUNT, R. D. Veterinary pathology. Quinta edição, Lea & Febiger, Filadélfia, EUA, 1983.

Na página 58, onde se lê:

MARGENAU, H. et al. Biblioteca científica Life - O cientista José Olympio, Rio de Janeiro, 1972.

leia-se:

MARGENAU, H. et al. Biblioteca científica Life - O cientista José Olympio, Rio de Janeiro, 1968.